

UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL AROMATISCHER AMINOSÄUREN
BEI LEBERKRANKHEITEN

von

HARTMUT KANNEGIESSER

1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554814_0074

Aus der Zweiten Medizinischen Universitätsklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P.Schölmerich

UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL AROMATISCHER AMINOSÄUREN
BEI LEBERKRANKHEITEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

HARTMUT KANNEGIESSER

aus Zwickau

MAINZ 1967

Dekan: Professor Dr. Diethelm
Referent: Privatdozent Dr. W. Gerok
Korreferent: Professor Dr. P. Schölmerich
Tag der mündl. Prüfung: 3. Juni 1967



Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst Mainz Steingasse 19

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Fragestellung	1
II. Biochemie des Phenylalanin- und Tyrosinabbaues	3
1. Phenylalanin- und Tyrosinabbau zu Fumarsäure und Acetessigsäure	3
2. Phenylalaninabbau zu Phenylacetylglutamin	5
3. Andere Stoffwechselwege des Tyrosins	6
III. Methoden	8
1. Bestimmung des Tyrosins	8
a) Methode nach CERIOTTI und SPANDRIO	9
b) Kombination der Methode nach CERIOTTI und SPANDRIO mit der enzymatischen Decarboxylierung des Tyrosins nach TASHIAN	11
2. Nachweis der p-Oxyphenylbrenztraubensäure	14
a) Methode nach WEGNER	15
b) Qualitativer Nachweis von p-Oxyphenylbrenztrauben- säure im Urin	16
3. Bestimmung der FeCl ₃ -positiven Substanzen (Phenylbrenztraubensäure)	17
IV. Ergebnisse	21
1. Versuchsanordnung	21
2. Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, Tyrosin und von FeCl ₃ -positiven Substanzen	23
a) Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure	23
b) Ausscheidung von Tyrosin und von FeCl ₃ -positiven Substanzen	23
3. Statistische Auswertung	26
a) Varianzanalyse	26
b) Versuchsmodell	26
c) Auswertung der Daten	27
d) Konfidenzgrenzen	28
e) Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen	28
V. Diskussion	29
VI. Zusammenfassung	34
Literaturverzeichnis	35

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Leber ist für den Stoffwechsel der Aminosäuren von besonderer Bedeutung. In tierexperimentellen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß nach partieller Hepatektomie die intravenöse Aminosäurezufuhr keinen Anstieg der Ammoniak- und Harnstoffkonzentration in Blut und Urin wie beim Normaltier bewirkt. Hingegen beeinträchtigt die Entfernung von Magen-Darm, Pankreas, Milz oder Nieren die Ammoniak- und Harnstoffbildung nicht. Diese Versuche zeigen, daß die Leber der wichtigste Ort der Aminosäurendesaminierung und der Harnstoffbildung ist (BOLLMANN u. MANN; MASON). In Übereinstimmung hiermit steht der Befund, daß die Aminosäurenkonzentration des Blutes bei Durchströmung der Leber abnimmt (VAN SLYKE u. Mitarb.), hingegen nach partieller Hepatektomie oder Eck'scher Fistel eine Zunahme der Aminosäuren im Blut und eine verstärkte Aminoacidurie auftreten (BOLLMANN u. Mitarb.; MANN u. MAGATH). Auch die Proteinsynthese, deren Substrate die Aminosäuren sind, findet etwa zur Hälfte in der Leber statt. Die besondere Bedeutung der Leber im Aminosäurenstoffwechsel geht auch daraus hervor, daß Enzyme für den spezifischen Abbau einzelner Aminosäuren ganz überwiegend oder sogar ausschließlich in der Leber vorhanden sind (Übersicht s. MEISTER). Am System der isoliert perfundierten Leber wurde gezeigt, daß die Leber ohne Mitwirkung anderer Organe einen bestimmten Spiegel der einzelnen Aminosäuren in der extrazellulären Flüssigkeit einzustellen vermag (SCHIMASSEK u. GEROK).

Auf Grund dieser im Tierversuch gewonnenen Befunde erhob sich die Frage, ob Erkrankungen der Leber zu Veränderungen im Aminosäurenstoffwechsel führen. Die quantitative Aminosäurenbestimmung im Blutserum bei verschiedenen Lebererkrankungen ergab, daß bei akuter Hepatitis und Lebercirrhose einzelne, beim Coma hepaticum fast alle Aminosäuren vermehrt sind (GEROK 1963, dort weitere Literaturangaben). Für die genauere Definierung der Störungen im Aminosäurenstoffwechsel ist es jedoch erforderlich, Zwischenglieder (Metaboliten) der Stoffwechselwege einzelner Aminosäuren quantitativ zu erfassen. Dabei erwies es sich als zweckmäßig, die Aminosäure, deren Stoffwechsel geprüft werden soll, im Überschuß zuzuführen, weil hierdurch die "funktionelle Reserve" der Leber voll ausgelastet und der "Anstau" von Metaboliten vor der gestörten Stoffwechselreaktion besonders deutlich wird. Durch Untersuchungen nach diesem Prinzip wurde nachgewiesen, daß bei der Entgiftung von Ammoniak im Harnstoffzyklus die Um-

wandlung von Citrullin in Arginin die limitierende Reaktion ist und daß bei Lebererkrankungen an dieser Stelle im Reaktionszyklus die erste Störung auftritt (GEROK 1962; GEROK u. HOCHMILLER). Ferner wurde gezeigt, daß der Abbau von Methionin bei Lebercirrhose überwiegend zu α -Aminobuttersäure und nicht wie bei Gesunden zu Cystein führt (GEROK, unveröffentlicht). Auch im Stoffwechsel der Aminosäure Histidin wurde eine derartige Störung nachgewiesen. Der Abbau dieser Aminosäure ist auf der Stufe der Formimino-glutaminsäure gehemmt. Histidin wird vermehrt zu Imidazolessigsäure abgebaut (GEROK u. BORNHÄUSER).

Der Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ist eng an die Leber geknüpft. Der Abbau dieser Aminosäuren erfolgt mit Hilfe spezifischer Enzyme, die in hoher Aktivität in der Leber vorkommen. Für Änderungen im Tyrosin-Phenylalanin-Stoffwechsel bei Lebererkrankungen gaben die Beobachtungen von ROKITANSKY, wonach bei akuter Leberdystrophie die Aminosäure Tyrosin in Form von Kristallen in nekrotischem Lebergewebe mikroskopisch sichtbar ist, erste Hinweise. In den letzten Jahren ist mehrfach gezeigt worden, daß bei akuter Hepatitis und Lebercirrhose Tyrosin und Phenylalanin im Serum in signifikant höherer Konzentration als bei Gesunden vorliegen (GEROK 1963, dort weitere Literatur). GROS u. KIRNBERGER haben nachgewiesen, daß bei verschiedenen Lebererkrankungen die Ausscheidung von Oxyphenylbrenztraubensäure, einem Metaboliten im Tyrosinabbau, gesteigert ist. Alle diese Befunde weisen darauf hin, daß bei Lebererkrankungen eine Störung des Tyrosin-Phenylalanin-Stoffwechsels vorliegt.

Durch die Untersuchungen, über die im folgenden berichtet wird, sollte geklärt werden, welche Reaktionen beim Abbau des Phenylalanins und Tyrosins bei Lebererkrankungen gestört sind. Zur Prüfung dieser Frage wurde die Ausscheidung von Tyrosin und Phenylbrenztraubensäure quantitativ, die Ausscheidung von Oxyphenylbrenztraubensäure qualitativ bei Gesunden, bei Kranken mit akuter Hepatitis und Kranken mit chronischer Hepatitis oder Lebercirrhose untersucht. Aus den oben angegebenen Gründen (Auslastung der funktionellen Reserve des Organs, Verstärkung des Anstaus von Metaboliten vor der gestörten Stoffwechselreaktion) wurden die Untersuchungen vor und nach peroraler Gabe von 10 g L-Phenylalanin durchgeführt.

II. BIOCHEMIE DES PHENYLALANIN- UND TYROSINABBAUES

Vor rund 60 Jahren lenkten Beobachtungen an Alkaptonurikern zum ersten Mal besondere Aufmerksamkeit auf den Stoffwechsel des Phenylalanins und des Tyrosins. Personen mit dieser angeborenen Stoffwechselanomalie scheiden im Gegensatz zu Gesunden Homogentisinsäure in den Harn aus. Wurde ihnen Phenylalanin oder Tyrosin verabreicht, so nahin ihre Homogentisinsäureausscheidung zu (NEUBAUER u. FALTA, FROMMERZ u. HERMANN). Ebenso reagierten gesunde Tiere, wenn sie mit sehr großen Mengen einer der beiden Aminosäuren gefüttert wurden (FALTA u. LANGSTEIN). Homogentisinsäure mußte demnach ein Zwischenprodukt im Abbau der beiden aromatischen Aminosäuren sein. Diese Erkenntnis war der Ausgangspunkt für zahlreiche spätere Untersuchungen, die die Abbaewege des Phenylalanins und des Tyrosins weitgehend aufgeklärt haben.

1. Phenylalanin- und Tyrosinabbau zu Fumarsäure und Acetessigsäure

Phenylalanin wird durch Hydroxylierung in para-Stellung zu Tyrosin umgewandelt. EMBDEN u. BALDES hatten bei Leberdurchströmungsversuchen mit Phenylalanin Tyrosin gewonnen. Der Patient von MEDES mit angeborener Tyrosinosis schied nach oraler Phenylalaningabe vermehrt Tyrosin aus. Die beweiskräftigsten Befunde lieferten Versuche mit radioaktiv markiertem Phenylalanin. Fütterte man Ratten mit Deuterium-markiertem Phenylalanin, so schieden sie deuteriumhaltiges Tyrosin aus (MOSS u. SCHOENHEIMER). Gab man dagegen markiertes Tyrosin, so ließ sich radioaktives Phenylalanin nicht nachweisen (GRAU u. STEELE). Damit war gezeigt, daß die Reaktion nicht umkehrbar ist. Phenylalaninhydroxylase katalysiert den Vorgang. Das Enzym kommt nur in der Leber vor (UDENFRIEND u. COOPER), besteht aus zwei Fraktionen (MITOMA) und bedarf zu seiner Wirksamkeit zweier Co-faktoren, Triphosphopyridinnucleotid und Tetrahydropteridin (KAUFMAN 1957, 1958, 1959).

Der weitere Abbau des Tyrosins zu Acetessigsäure und Fumarsäure wurde durch Untersuchungen mit radioaktivem Tyrosin eindeutig aufgeklärt. Die entscheidenden Befunde waren:

- a. Das α -C-Atom des Tyrosins wird zum Carboxyl-C-Atom der Acetessigsäure (WEINHOUSE u. MILLINGTON 1948, SCHEPARTZ u. GURIN).
- b. Das C-Atom 2 des Ringes wird zum Carbonyl-C-Atom der Acetessigsäure

- re (WEINHOUSE u. MILLINGTON 1948, SCHEPARTZ u. GURIN).
- c. Das C-Atom 1 oder 3 des Ringes wird zum endständigen C-Atom der Acetessigsäure (WEINHOUSE u. MILLINGTON 1948, SCHEPARTZ u. GURIN).
 - d. Das β -C-Atom des Tyrosins wird zum α -C-Atom der Acetessigsäure (WEINHOUSE u. MILLINGTON 1948, 1949).

Damit war bewiesen, daß während des Abbaues eine Verschiebung der Seitenkette eintreten mußte.

Vom Tyrosin führt der erste Schritt zur p-Oxyphenylbrenztraubensäure (LA DU u. GREENBERG). Die NH_2 -Gruppe des Tyrosins wird unter Mitwirkung von Glutamat-Tyrosin-Transaminase auf α -Ketoglutarinsäure übertragen, wobei Glutaminsäure entsteht (LE MAY-KNOX u. KNOX, SCHEPARTZ 1951). Das Enzym konnte weitgehend rein dargestellt werden (CANELLAKIS u. COHEN, KENNEY). Für eine Transaminierung (nicht Oxydierung) des Tyrosins spricht die Beobachtung, daß die vollständige Oxydation sowohl des Tyrosins als auch der p-Oxyphenylbrenztraubensäure die gleiche Menge, nämlich vier Atome Sauerstoff erfordert (LA DU u. GREENBERG, SCHEPARTZ). LE MAY-KNOX und KNOX nahmen zunächst an, daß 2,5-Dihydroxyphenylalanin das primäre Oxydationsprodukt der p-Oxyphenylbrenztraubensäure ist. Sie haben jedoch selbst zeigen können, daß diese Verbindung in einem System, das Tyrosin vollständig abbauen kann, nicht oxydiert wird. 2,5-Dihydroxyphenylalanin kommt deshalb als Zwischenprodukt nicht in Betracht.

Nach heutiger Anschauung wird p-Oxyphenylbrenztraubensäure in Homogentisinsäure überführt. Der Ring wird hydroxyliert, die Seitenkette verschoben und decarboxyliert, Ascorbinsäure spielt dabei eine wichtige Rolle (LE MAY-KNOX u. KNOX, WILLIAMS u. SREENIVASAN 1953 u. 1953). In neueren Untersuchungen konnte das maßgebende Enzym, p-Oxyphenylbrenztraubensäure-oxydase, rein dargestellt werden (LA DU u. ZANNONI). Tyrosinbelastung normaler und skorbutischer Meerschweinchen führte nicht nur zur Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, sondern auch zu einer herabgesetzten Aktivität der Oxydase. Durch Verabreichung von Ascorbinsäure ließen sich die normalen Verhältnisse wieder herstellen. Man schreibt deshalb der Ascorbinsäure eine Schutzwirkung auf das Enzym zu, welches durch Substratüberschuß gehemmt wird. Die Rolle der Ascorbinsäure ist bisher nicht näher geklärt, sie fungiert jedenfalls bei dieser Reaktion nicht als Coenzym (KNOX u. GOSWAMI, ZANNONI u. LA DU 1960 und 1960).

Aus Homogentisinsäure entsteht Maleylacetessigsäure (CRANDALL u. HALKIS, KNOX u. EDWARDS). In-vitro-Versuche zeigten, daß das zugehörige Enzym,

Homogentisinsäureoxydase, durch Eisenionen, Ascorbinsäure und Glutathion in seiner Aktivität gefördert wird (CRANDALL). Das Enzym fehlt bei Patienten mit Alkaptonurie (LA DU, ZANNONI u. Mitarbb. 1958).

Maleylacetessigsäure wird unter Mitwirkung einer spezifischen Isomerase in seine trans-Form Fumarylacetessigsäure umgewandelt, als Coenzym ist Glutathion notwendig (EDWARDS u. KNOX).

Der letzte Schritt besteht in einer hydrolytischen Spaltung der Fumaryllessigsäure zu Fumarsäure und Acetessigsäure. Das entsprechende Enzym (RAVDIN u. CRANDALL) katalysiert auch die Hydrolyse verschiedener anderer Diketo-säuren. Es war bereits aus Lebergewebe isoliert worden, bevor man sein eigentliches Substrat Fumaryllessigsäure kannte (MEISTER u. GREENSTEIN, MEISTER 1949).

2. Phenylalaninabbau zu Phenylacetylglutamin

In welchem Umfang dieser zweite Abbauweg beim Gesunden benutzt wird, ist nicht bekannt. Er besteht aus drei Schritten: Transaminierung des Phenylalanins zu Phenylbrenztraubensäure, Decarboxylierung zu Phenyllessigsäure, Kuppelung der Phenyllessigsäure an L-Glutamin. Diese Vorstellungen werden durch folgende Befunde gestützt:

- a. Bei Oligophrenia phenylpyruvica ist die Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin blockiert, es erscheint infolgedessen Phenylbrenztraubensäure in großen Mengen im Harn (FÖLLING).
- b. Verabreicht man Normalpersonen Phenyllessigsäure, so erscheint diese quantitativ als Phenylacetylglutamin im Urin (AMBROSE u. Mitarb.).
- c. Radioaktiv markiertes Phenylalanin wird von Lebergewebe in vitro zu radioaktivem Phenylacetylglutamin umgewandelt (MOLDAVE u. MEISTER).

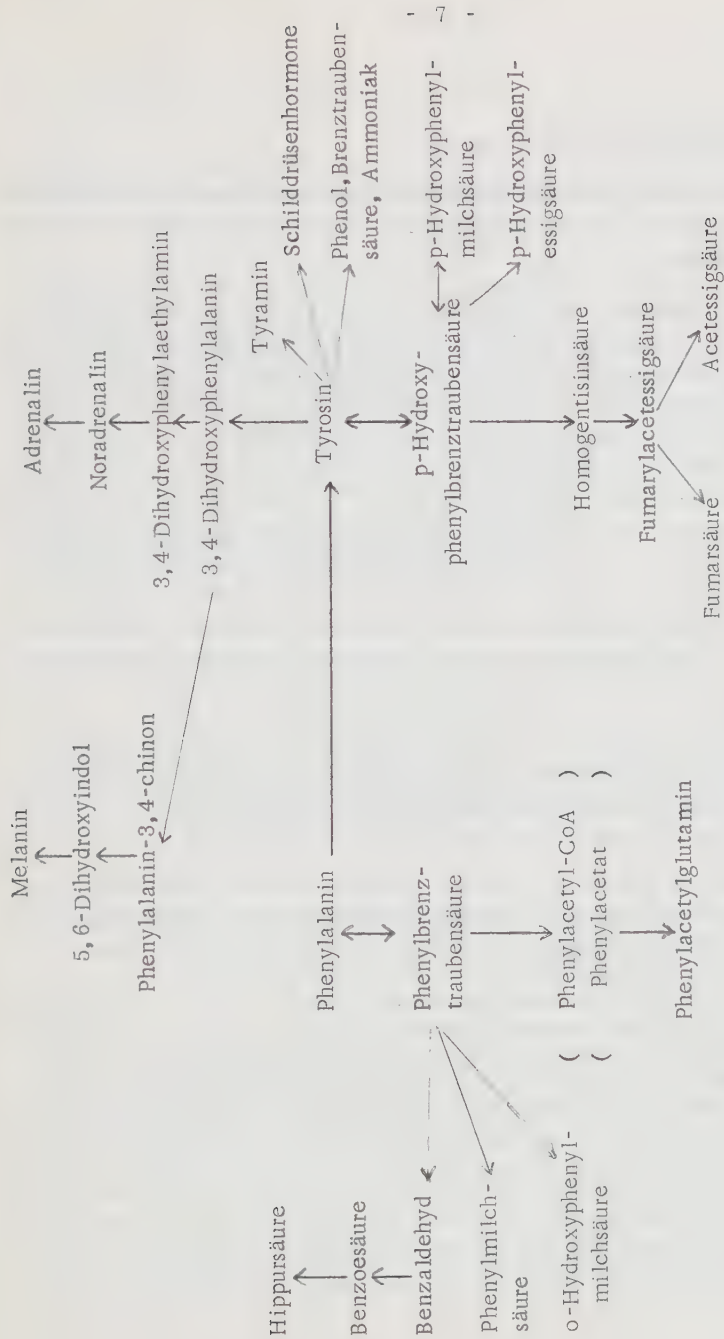
Aus Phenylbrenztraubensäure wird daneben auch Hippursäure gebildet. Zwar stammt der größere Teil der im Urin erscheinenden Hippursäure aus Benzoesäure, die mit der Nahrung aufgenommen wird (SCHREIER u. Mitarbb.). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß aus markiertem Phenylalanin markierte Hippursäure entsteht (BRUNS u. Mitarbb.). Hypothetische Zwischenprodukte sind Benzaldehyd und Benzoesäure.

3. Andere Stoffwechselwege des Tyrosins

Eine bedeutsame Rolle spielt Tyrosin als Ausgangspunkt für die Bildung von Katecholaminen. Durch die Anlagerung einer zweiten Hydroxylgruppe entsteht 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa). Dieses wird decarboxyliert zu 3,4-Dihydroxyphenylaethylamin. Die Hydroxylierung am ringnahen C-Atom der Seitenkette ergibt Noradrenalin. Aus Noradrenalin wird durch N-Methylierung Adrenalin (Literatur bei MEISTER).

Erwähnt sei noch 3,4-Dihydroxyphenylalanin als Vorstufe des Melanins und die Bedeutung des Tyrosins für die Bildung der Schilddrüsenhormone.

Eine Übersicht der heutigen Vorstellungen über den Stoffwechsel von Phenylalanin und Tyrosin gibt das nebenstehende Schema wieder.



Stoffwechsel von Phenylalanin und Tyrosin
(nach MEISTER)

III. METHODEN

1. Bestimmung des Tyrosins

Die einfachste Methode zur quantitativen Tyrosinbestimmung beruht auf der Reaktion des Tyrosins mit Millon's Reagens, die Reaktion ist jedoch nicht für Tyrosin spezifisch.

GERNGROSS u. Mitarbb. beschrieben die Bildung eines roten Farbkomplexes aus Tyrosin und α -Nitroso- β -Naphthol unter Zusatz von Salpetersäure. Diese Reaktion ist spezifisch für alle para-substituierten Phenole. Die rote Farbe bleicht aber schnell aus, so daß die Reaktion in ihrer ursprünglichen Form zur quantitativ-kolorimetrischen Bestimmung nicht geeignet war. UDENFRIEND u. COOPER änderten deshalb das Verfahren und konnten einen stabilen gelben Farbkomplex erzeugen, dessen Intensität der Tyrosinkonzentration in der Testlösung proportional war. CERIOTTI u. SPANDRIO sowie OTTAWAY griffen die Reaktion mit α -Nitroso- β -Naphthol in getrennten Untersuchungen wieder auf mit dem Ziel, den roten Farbkomplex zu stabilisieren. CERIOTTI u. SPANDRIO gelang dies durch Zusatz von rauchender Salzsäure, während OTTAWAY ein Stabilisierungsreagens aus Aceton, Kochsalz und Eisen-III-Chlorid zu fügte.

Zwei enzymatische Methoden beruhen auf der Fähigkeit von *Streptococcus faecalis*, L-Tyrosin zu Tyramin zu decarboxylieren. LAWRIE bestimmte das dabei freiwerdende Kohlendioxyd mit dem Warburg'schen Apparat, TASHIAN extrahierte das Tyramin und bestimmte es nach UDENFRIEND u. COOPER.

STEIN u. MOORE führten mit dem von ihnen entwickelten säulenchromatographischen Verfahren umfassende Aminosäureanalysen durch, in deren Rahmen sie auch das Tyrosin bestimmten.

WOODSON u. Mitarbb. verwendeten mikrobiologische Methoden für ihre Untersuchungen über die Tyrosinausscheidung im Urin.

Für die eigenen Tyrosinbestimmungen boten sich zunächst die relativ einfachen kolorimetrischen Verfahren an. Die Methode von CERIOTTI u. SPANDRIO wurde auf ihre Brauchbarkeit geprüft.

a) Methode nach CERIOTTI und SPANDRIO

Reagentien:

0,1%ige α -Nitroso- β -Naphthol-Lösung: 50 mg fein pulverisiertes α -Nitroso- β -Naphthol wurden in etwa 30 ml 0,1n-NaOH gelöst, gekocht, nach Abkühlen filtriert und mit 0,1n-NaOH auf 50 ml aufgefüllt. Trotz Kochens gelang es nicht, die Substanz vollständig zu lösen. Schwankungen in der Konzentration der Farbstofflösung ließen sich nicht vermeiden. Andererseits war es auch nicht möglich, eine größere Menge zu bereiten und aufzubewahren, denn die Lösung hatte schon nach 24 Stunden erheblich an Färbekraft eingebüßt, nach 48 Stunden war sie völlig unbrauchbar. Die α -Nitroso- β -Naphthol-Lösung wurde deshalb jeweils am Versuchstag frisch hergestellt, Fehler durch die Unterschiede in der Konzentration wurden durch Tyrosinbestimmung an einer Testlösung bekannter Konzentration ausgeschaltet.

2,5n-HNO₃

Rauchende Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,19)

Tyrosin-Testlösung 20 μ g/ml, gelöst in 0,1n-HCl

Ausführung:

5 ml der zu untersuchenden Lösung wurden in ein Reagenzglas pipettiert und mit 1 ml α -Nitroso- β -Naphthol-Lösung, 0,5 ml HNO₃ und 1,5 ml rauchender Salzsäure versetzt. Nach kräftigem Umschütteln wurde das Gemisch 2 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend 2 Minuten in kaltem Wasser gekühlt. Als Leerwert diente ein in gleicher Weise behandelter Ansatz mit destilliertem Wasser. Die Extinktionen wurden mit einem Eppendorf-Photometer bei 546 m μ und 1 cm Schichtdicke gemessen.

Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

Nach dieser Vorschrift wurden die Extinktionen (E) von absteigenden Konzentrationen der Tyrosin-Testlösung gemessen. Die Ergebnisse zeigen Tab. 1 und Abb.1.

Die Versuche zeigen, daß das Lambert-Beer'sche Gesetz in dem gewählten Konzentrationsbereich Gültigkeit besitzt.

Eigenschaften des Farbkomplexes:

Nach CERIOTTI und SPANDRIO bleibt der Farbkomplex mindestens 3 Stunden nach Entnahme aus dem Wasserbad stabil. Bei den eigenen Untersuchungen blieb die Extinktion nur 20 Minuten konstant und fiel dann um etwa 1% in je 10 Minuten. Nach 60 Minuten betrug sie noch 96% des Ausgangswertes.

μg Tyrosin/ml	E
20	0.481
16	0.385
12	0.292
8	0.184
4	0.088

Tab.1 Beziehung zwischen Tyrosinkonzentration und Extinktion (E) bei der kolorimetrischen Tyrosinbestimmung nach CERIOTTI und SPANDRIO.

Einen deutlichen Einfluß auf die Intensität der roten Farbe hatte die Zeit t, die zwischen der Mischung der Reagentien und dem Einbringen ins kochende Wasserbad verstrich. Tab.2 zeigt den Zusammenhang zwischen t und der Extinktion E ausgedrückt in Prozent des Wertes, der bei sofortigem Einbringen ins Wasserbad gemessen wurde:

t (min.)	E
5	105 %
10	106 %
15	110 %
25	120 %
75	121 %

Tab.2 Beziehung zwischen dem Zeitintervall t (von der Mischung der Reagentien bis zum Einbringen ins kochende Wasserbad) und der Extinktion E bei der Tyrosinbestimmung nach CERIOTTI und SPANDRIO.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden bei allen folgenden Bestimmungen die Ansätze sofort nach der Mischung erhitzt. Der ohnehin erforderliche Ansatz eines Standardwertes gewährte eine zusätzliche Sicherheit.

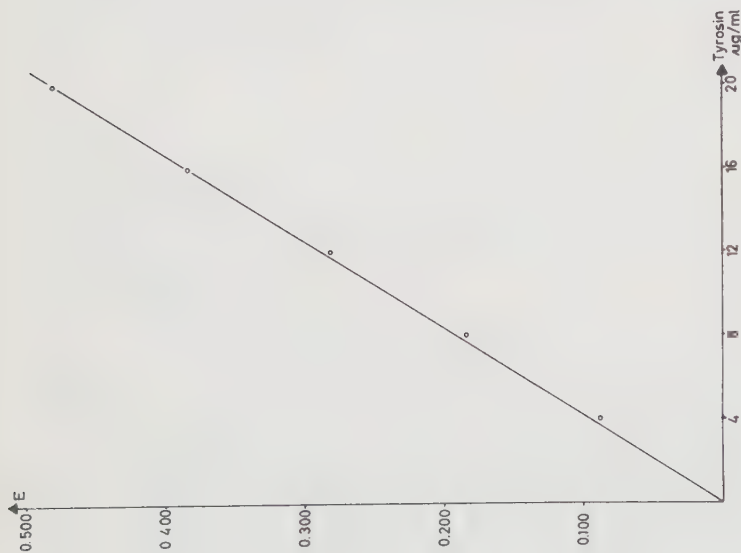


Abb. 1 Beziehung zwischen Tyrosinkonzentration und Extinktion (E) bei der kolorimetrischen Tyrosinbestimmung nach CERIOTTI und SPANDRIO.

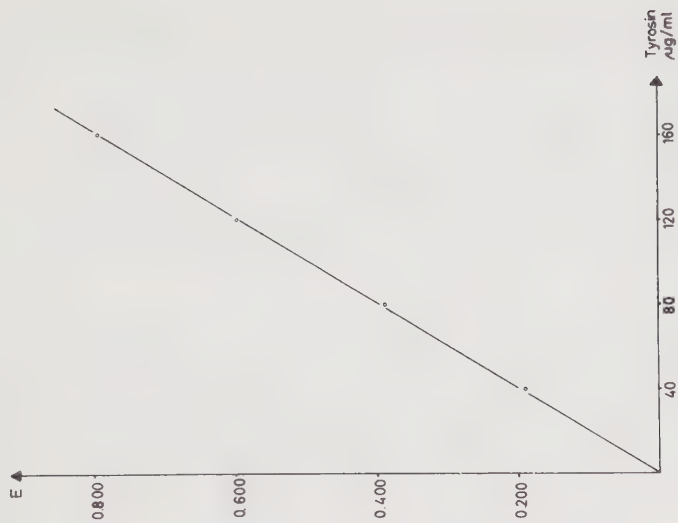


Abb. 2 Beziehung zwischen Tyrosinkonzentration der Testlösung und Extinktion bei enzymatisch-kolorimetrischer Tyrosinbestimmung.

Anwendung auf Urin:

Bei der Untersuchung von Urinproben ist der tatsächliche Leerwert (die Extinktion des theoretisch tyrosinfreien Urins) nicht meßbar. Es wurde als Leerwert ein Ansatz verwandt, dem anstelle von α -Nitroso- β -Naphthol-Lösung 1 ml destilliertes Wasser zugesetzt wurde. Dabei ergaben sich jedoch Leerwerte, die das 8-10 Fache der Extinktionsdifferenz betrug und die dadurch eine genaue Tyrosinbestimmung unmöglich machten. Das Verfahren war deshalb für die unmittelbare Anwendung auf Urin nicht geeignet.

b) Kombination der Methode nach CERIOTTI und SPANDRIO mit der enzymatischen Decarboxylierung des Tyrosins nach TASHIAN

Die kolorimetrische Methode von CERIOTTI und SPANDRIO lieferte gute Ergebnisse, wenn sie an die enzymatische Decarboxylierung des Tyrosins nach TASHIAN zur Bestimmung des dabei gebildeten Tyramins angeschlossen wurde.

Reagentien:

L-Tyrosin-Decarboxylase der Fa. Mann Research Laboratories, New York. Das pulverförmige Enzympräparat wurde 15 Minuten vor Gebrauch in Citratpuffer aufgeschwemmt und die Suspension unmittelbar vor Gebrauch noch einmal kräftig geschüttelt. Das Enzym wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml Puffer verwendet.

0,7M-Citratpuffer, pH 5,5 nach Sörensen

NaCl p.a.

1N-NaOH

1N-HCl

Essigsäureäthylester p.a.

0,1% ige α -Nitroso- β -Naphthol-Lösung (Zubereitung wie oben)

2,5N-HNO₃

Rauchende Salzsäure

Tyrosin-Testlösung verschiedener Konzentrationen.

Ausführung:

2 ml der zu untersuchenden Lösung wurden mit 0,5 ml der Enzyaufschwemmung und 0,5 ml Citratpuffer in einem Reagenzglas 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung wurden 0,7 g NaCl und 0,5 ml 1N-NaOH zugegeben, 10 ml Essigsäureäthylester zugefügt und 5 Minuten kräftig geschüttelt. 8 ml der organischen Phase wurden in ein anderes Reagenzglas überführt und

mit 2,5 ml 1n-HCl 2 Minuten geschüttelt. 2 ml der wässrigen Phase wurden in ein weiteres Reagenzglas gebracht, 3 ml destilliertes Wasser zugegeben und die Reaktion nach CERIOTTI und SPANDRIO ausgeführt. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 0,5 ml Citratpuffer anstelle des Enzyms.

Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

In dieser Weise wurden die Extinktionen (E) an L-Tyrosin-Lösungen verschiedener Konzentrationen (40 - 160 $\mu\text{g/ml}$) bestimmt. Aus der folgenden Tabelle 3 und aus der zugehörigen Abb.2 ist zu entnehmen, daß das Lambert-Beer'sche Gesetz in dem gewählten Konzentrationbereich gilt.

μg Tyrosin/ml	E
160	0,795
120	0,599
80	0,387
40	0,189
0	0,000

Tab.3 Beziehung zwischen Tyrosinkonzentration der Testlösung und Extinktion bei enzymatisch-kolorimetrischer Tyrosinbestimmung.

Anwendung auf Urin:

Zur Bestimmung der Tyrosinkonzentration im Urin war aus den bereits erwähnten Gründen der Ansatz eines Standardwertes erforderlich. Zur Prüfung, ob dem Urin zugesetztes Tyrosin quantitativ wiedergefunden wird, wurden an folgenden Ansätzen Tyrosinbestimmungen nach der oben angeführten Methode ausgeführt:

I	Tyrosinlösung 160 $\mu\text{g/ml}$	mit Enzym (Standardhauptwert)
II	Destilliertes Wasser	mit Enzym (Standardleerwert)
III	Urin mit Tyrosinzusatz	mit Enzym (unbekannter Hauptwert)
IV	Urin ohne Tyrosinzusatz	mit Enzym (unbekannter Leerwert)

Die Differenz der Extinktionen von III und IV entsprach der dem Urin zugesetzten Tyrosinmenge und war zur Differenz aus I und II in Beziehung zu setzen. Die aus der Differenz von III und IV ermittelten Tyrosinkonzentrationen in Urinproben lagen regelmäßig um 10 bis 30% niedriger als den tatsächlich zu-

gesetzten Tyrosinmengen entsprochen hätte. Aus nicht näher untersuchten Gründen hemmt Urin die enzymatische oder kolorimetrische Reaktion. Um dies noch deutlicher zu zeigen, wurden einerseits dem Urin einer Normalperson, andererseits einem gleichen Volumen destillierten Wassers verschiedene Mengen L-Tyrosin zugesetzt und die Reaktion nach TASHIAN/CERIOTTI-SPANDRIO ausgeführt.

Tyrosinzusatz in $\mu\text{g/ml}$	E b. Tyrosinzusatz zu Urin	E b. Tyrosin- Testlösung
0	0,000	0,000
60	0,258	0,307
120	0,528	0,618
180	0,752	0,969

Tab.4 Extinktionen (E) bei Tyrosinbestimmung an Urin mit bekanntem Tyrosinzusatz und an Tyrosin-Testlösungen gleicher Konzentration

Aus Tab.4 und Abb.3 ist zu entnehmen:

In beiden Fällen besteht eine lineare Beziehung zwischen Tyrosinkonzentration und Extinktion. Der Anstieg der Eichgeraden ist jedoch bei Tyrosinbestimmung im Urin kleiner als bei Bestimmung von Tyrosin in rein wässriger Lösung.

Für die Bestimmung unbekannter Tyrosinkonzentrationen im Urin war daher der Ansatz eines inneren Standards unerlässlich. Für jede einzelne Tyrosinbestimmung waren demnach drei Ansätze zu untersuchen:

- I Urin + Tyrosinzusatz mit Enzym (Standardwert).
Zu 9 ml Urin wurde 1 ml einer L-Tyrosin-Standardlösung von $580 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Dies entsprach einem Konzentrationszuwachs von $58 \mu\text{g/ml}$ Urin.
- II Urin + destilliertes Wasser mit Enzym (Hauptwert).
Zu 9 ml Urin wurde 1 ml destilliertes Wasser zugesetzt, der Verdünnungsfaktor wurde später bei der Berechnung berücksichtigt.
- III Urin + destilliertes Wasser ohne Enzym (Leerwert).

Die Extinktionsdifferenz aus I und II lieferte den Extinktionszuwachs für die

bekannte Konzentrationsdifferenz von $58 \mu\text{g/ml}$. Die Differenz aus II und III entsprach der unbekannten Tyrosinkonzentration x , die sich unter Berücksichtigung des Standardwertes berechnen ließ. Abb.4 macht die Beziehungen anschaulich.

2. Nachweis der p-Oxyphenylbrenztraubensäure

1941 gaben FELIX und TESKE eine klinische Funktionsprüfung der Leber an, die darauf beruht, daß der Abbau der p-Oxyphenylbrenztraubensäure (OBS) bei Leberkranken gestört ist. Zur Bestimmung der OBS im Urin benutzten sie die Millon'sche Reaktion. Die geringe Spezifität der Reaktion hat verschiedene Untersucher veranlaßt, nach spezifischeren und technisch möglichst einfach durchführbaren Methoden zu suchen.

CREMER und BERGER versetzten den Harn mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, extrahierten die Hydrazone mit Äther, adsorbierten an Aluminiumoxyd und eluierten mit Aceton. Mit diesem Verfahren war es möglich, das OBS-Hydraton von den Hydrazonen anderer im Urin vorkommender α -Ketosäuren abzutrennen.

Eine Methode von KIRBERGER gründete sich ebenfalls auf die Fällung der Hydrazone, verzichtete aber auf Adsorption und Elution. Das Verfahren erwies sich als wenig spezifisch und für die Bestimmung der OBS im Urin als unbrauchbar, wie eine eigene orientierende Prüfung ergab. WEGNER verwendete die auf para-substituierte Phenole spezifische Reaktion mittels α -Nitroso- β -Naphthol, nachdem er vorher die OBS zu p-Oxyphenylmilchsäure reduziert hatte. Über eigene Erfahrungen mit dieser Methode wird unten berichtet.

LEONHARDI u. Mitarbb. kuppelten die OBS mit einer Diazoverbindung zu einem Farbstoff, den sie an einer Aluminiumsäule adsorbierten und nach Elution kolorimetrisch bestimmten.

Die Methoden von CREMER und BERGER, sowie die von LEONHARDI u. Mitarbb. kamen wegen ihrer Aufwendigkeit für die Reihenuntersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht in Betracht. Die Methode von WEGNER wurde einer näheren Prüfung unterzogen.

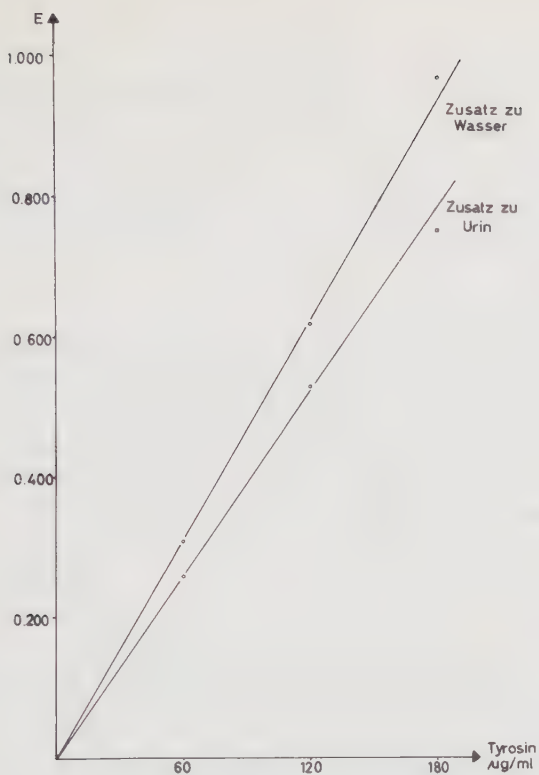


Abb.3 Extinktionen (E) bei Tyrosinbestimmung an Urin mit bekanntem Tyrosinzusatz und an Tyrosin-Testlösungen gleicher Konzentration.

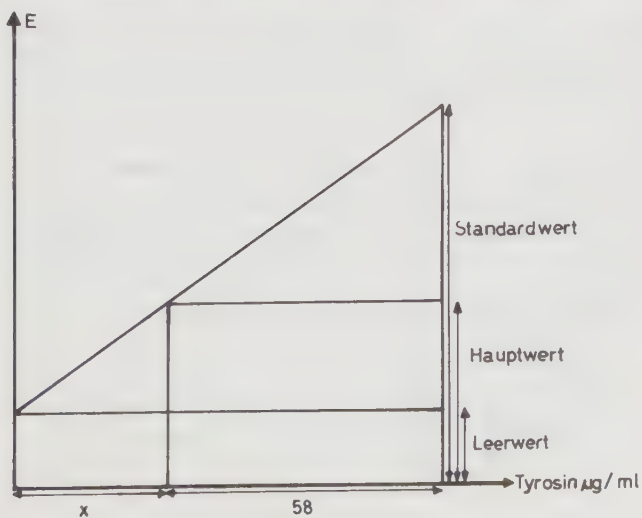


Abb.4 Graphische Darstellung zur Berechnung der unbekannten Tyrosinkonzentration x aus Standardwert, Hauptwert und Leerwert.

a) Methode nach WEGNER

Reagentien:

0,4 n- H_2SO_4 ,

grob pulverisiertes Zink,

Reagentien für die Tyrosinbestimmung nach CERIOTTI und SPANDRIO (s. S. 9).

Ausführung:

Der zu untersuchende 24-Stunden-Urin wurde mit destilliertem Wasser auf 3000 ml aufgefüllt. In je ein Reagenzglas wurden 0,4 ml des verdünnten Urins und 8 ml 0,4 n- H_2SO_4 einpipettiert. Einem der beiden Ansätze wurde 0,4 g Zink zur Reduktion der OBS zugefügt, dann wurde dieser Ansatz 10 Minuten geschüttelt und filtriert. Je 5 ml der beiden Gemische wurden danach der Reaktion nach CERIOTTI und SPANDRIO unterzogen. Nach WEGNER ist die Differenz der Extinktionen beider Ansätze der im Urin enthaltenen OBS-Menge proportional.

Aufstellung einer Eichkurve:

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden zu Teilmengen des 24-Stunden-Urins einer Normalperson verschiedene Mengen OBS zugesetzt und der Urin entsprechend mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die höchste zugefügte OBS-Menge entsprach einer Tagesausscheidung von 1500 mg. Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, eine zufriedenstellende Eichkurve zu gewinnen. Zwei Gründe waren dafür verantwortlich:

- 1) Die Kurve besitzt einen sehr flachen Anstieg. Für die OBS-Ausscheidung von 1500 mg/Tag wurde eine Extinktionsdifferenz von nur 0.090 gemessen. Diese im Vergleich zum Leerwert niedrige Extinktionsdifferenz bedingt einen großen methodischen Fehler.
- 2) Die Kurve geht nicht durch den Nullpunkt. Im Gegensatz zu WEGNERS Befunden fand sich bei sämtlichen Harnen gesunder und leberkranker Personen ohne OBS-Zusatz ein Unterschied in der Stärke der Farbreaktion vor und nach Reduktion.

Es wurde deshalb auf die quantitative Bestimmung der OBS verzichtet.

b) Qualitativer Nachweis von p-Oxyphenylbrenztraubensäure (OBS) im Urin

Die Hydrazone der im Harn enthaltenen α -Ketosäuren wurden dünn-schicht-chromatographisch getrennt. Die Aufarbeitung des Urins erfolgte, abgesehen von kleinen Modifikationen, wie von CAVALLINI, FRONTALI u. TOSCHI für die Papierchromatographie angegeben.

Reagentien:

Gesättigte 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung in 1 n-HCl

Äther p. a.

Essigsäureaethylester p. a.

Sodalösung 10%

konzentrierte HCl

Ausführung:

100 ml Urin (100 ml Testlösung) wurden mit 20 ml gesättigter 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung versetzt. Nach 1 Stunde wurde einmal mit 30 ml und zweimal mit je 20 ml Äther extrahiert. Der Äther wurde im Rotationsverdampfer vollständig abgedampft, der Rückstand in 20 ml Essigsäureaethylester gelöst und zweimal mit je 10 ml nachgewaschen. Anschließend wurde dreimal mit je 20 ml Sodalösung ausgeschüttelt und mit konzentrierter Salzsäure bis zu deutlich saurer Reaktion angesäuert. Dann wurde dreimal mit je 20 ml Essigsäureaethylester ausgeschüttelt, der Essigsäureaethylester verdampft und der Rückstand in 6 ml Essigsäureaethylester aufgenommen.

In dieser Weise wurden Testlösungen der im Urin zu erwartenden α -Ketosäuren (α -Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure, Phenylbrenztraubensäure, OBS) behandelt. Je 10 μ l hydrazonehaltige Lösung wurden auf eine 0,5 mm dicke Kieselgelschicht aufgetragen und mit wassergesättigtem n-Butanol entwickelt. Folgende R_F -Werte wurden ermittelt (Tab.5):

OBS I	0,55
OBS II	0,43
Phenylbrenztraubensäure	0,43
Brenztraubensäure	0,29
α -Ketoglutarsäure	0,11

Tab.5 R_F -Werte von Hydrazoneen verschiedener α -Ketosäuren bei Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel.
Fließmittel n-Butanol / Wasser.

Bei der Chromatographie des OBS-Hydrazons fiel auf, daß stets zwei Flecke mit unterschiedlichem R_F -Wert entstanden. Mittels der auf para-substituierte Phenole spezifischen Reaktion mit α -Nitroso- β -Naphthol ließ sich wahrscheinlich machen, daß es sich in beiden Fällen um OBS handelt. Möglicherweise entsteht bei der Hydrazonfällung aus einem Teil der OBS das Säurechlorid.

Aus der Tabelle der R_F -Werte ist ersichtlich, daß die langsame Fraktion der OBS zusammen mit der Phenylbrenztraubensäure wandert. Die Trennung bei der gelang durch Entwicklung in der zweiten Dimension. Als Fließmittel diente Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/Ammoniak 25% 50/35/15/7 (v/v/v/v), wie es BÜRGI u. Mitarbb. für die Dünnschichtchromatographie von ätherlöslichen DNP-Aminosäuren verwendeten. Folgende R_F -Werte wurden für die zweite Dimension gemessen (Tab.6):

OBS I	0,47
OBS II	0,31
Phenylbrenztraubensäure	0,45
Brenztraubensäure	0,29
α -Ketoglutar Säure	0,11

Tab.6 R_F -Werte von Hydrazonen verschiedener α -Ketosäuren bei Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel.
Fließmittel Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/Ammoniak 25%
50/35/15/7

3. Bestimmung der $FeCl_3$ -positiven Substanzen (Phenylbrenztraubensäure)

Der Urin von Kranken mit Oligophrenia phenylpyruvica färbt sich auf Zusatz von Eisen-III-Chlorid blau. FÖLLING konnte zeigen, daß die Verfärbung auf die Gegenwart von Phenylbrenztraubensäure (PBS) zurückgeht. In der Folgezeit wurden verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung angegeben, die die klinische Kontrolle des Verlaufes der Krankheit ermöglichen sollten.

PENROSE und QUASTEL fällten das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der PBS und bestimmten die Verbindung nach Zugabe von Natronlauge vergleichskolorimetrisch. Das Verfahren erfaßt auch die Hydrazone anderer im Harn vorkommender α -Ketosäuren und ist deshalb nicht spezifisch.

Spezifischer sind jene Methoden, die wie die qualitative Fölling'sche Probe auf der Reaktion mit Eisensalzen beruhen. BERRY und WOOLF extrahierten den Urin mit Äther, lösten den Rückstand in Glycinpuffer und kolorimetrierten mit Eisen-III-Chlorid. KEUP trennte die Phenylbrenztraubensäure chromatographisch ab und schloß die Reaktion mit Eisen-III-Chlorid an. Beide Methoden haben den Nachteil, daß der blaue Farbkomplex nicht stabil ist. Innerhalb weniger Minuten steigt die Extinktion bis zu einem Maximum an, um ebenso schnell wieder abzufallen.

THE u. Mitarb. wiesen nach, daß die Geschwindigkeit des Extinktionsanstiegs und -abfalls temperaturabhängig ist, daß jedoch die maximale Extinktion von der Temperatur nicht beeinflußt wird. Sie verzichteten auf die vorherige Abtrennung der PBS aus dem Urin.

KROPP und LANG verwendeten Eisencitrat anstelle von Eisen-III-Chlorid. Ihr Farbkomplex war einige Minuten stabil.

Für die eigenen Bestimmungen wurde die Methode von THE u. Mitarb. benutzt.

Reagentien:

Glycinpuffer, pH 2,2 : 4,35 g Glykokoll und 3,40 g NaCl wurden in 420 ml 0,1 n-HCl gelöst und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt; 10%ige Lösung von FeCl_3 in destilliertem Wasser; PBS-Testlösungen in Konzentrationen von 10 - 50 mg% in 0,1 n-HCl.

Ausführung:

1 ml der zu untersuchenden Lösung wurde mit 5 ml der Pufferlösung gemischt, dann 0,2 ml FeCl_3 -Lösung zugegeben, nochmals gemischt und die maximale Extinktion mit einem Eppendorf-Photometer bei 644 m μ und 1 cm Schichtdicke gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit destilliertem Wasser anstelle der PBS-Lösung.

Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

In dieser Weise wurden absteigende Konzentrationen einer 50%igen PBS-Lösung behandelt und die Extinktionen bestimmt. Die folgende Tab. 7 und die Abb. 5 zeigen die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes in dem gewählten Konzentrationsbereich.

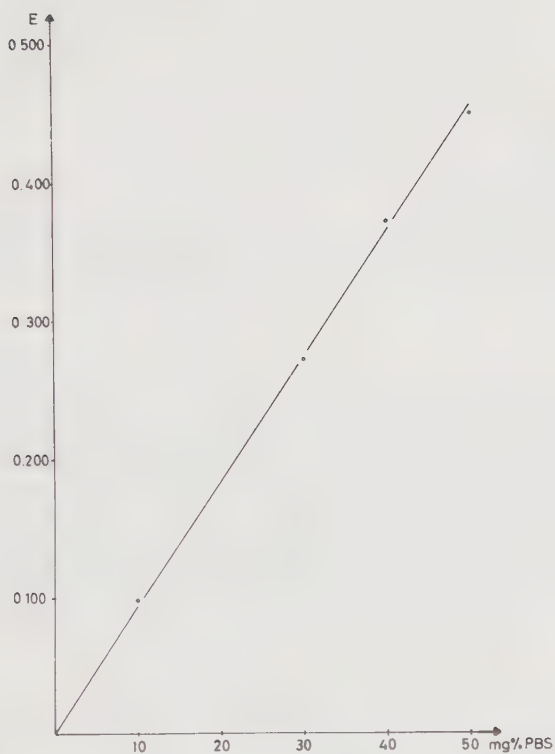


Abb. 5 Beziehung zwischen Konzentration von Phenylbrenztraubensäure (PBS) und Extinktion (E) bei der PBS-Bestimmung nach THE u. Mitarb. an Testlösungen.

mg% PBS	E
50	0.449
40	0.370
30	0.271
10	0.096
0	0.000

Tab.7 Beziehung zwischen Konzentration von Phenylbrenztraubensäure (PBS) und Extinktion (E) bei der PBS-Bestimmung nach THE u. Mitarb. an Testlösungen

Anwendung auf Urin:

Dem Urin eines Gesunden wurden verschiedene Mengen PBS zugesetzt, so daß die gleichen Konzentrationen resultierten wie in den oben angegebenen wässrigen Testlösungen. Anschließend wurden die Extinktionen bestimmt. Als Leerwert wurde die Extinktion abgezogen, die für den Urin ohne PBS-Zusatz gemessen wurde (0.026). Aus der Tab.8 ist zu entnehmen, daß ein linearer Zusammenhang zwischen zugesetzter PBS-Konzentration und Extinktion (nach Abzug des Leerwertes) besteht:

mg% PBS (Zusatz zu Urin)	E
50	0.345
40	0.262
30	0.186
20	0.148
10	0.048
0	0.000

Tab.8 Beziehung zwischen Konzentration von Phenylbrenztraubensäure (PBS) und Extinktion (E) bei der PBS-Bestimmung nach THE u. Mitarb. an Urin mit PBS-Zusatz

Ein Vergleich von Tab.7 und 8 zeigt, daß die dem Urin zugesetzte PBS nicht quantitativ wiedergefunden wird. Die Extinktionen bei PBS-Zusatz zu Urin liegen deutlich niedriger als die der entsprechenden PBS-Konzentrationen in wässriger Lösung. Aus diesem Grunde wurde bei allen Bestimmungen ebenso wie bei der Tyrosinbestimmung ein innerer Standardwert mitangesetzt.

Spezifität der Methode:

Die Methode ist nicht streng spezifisch. Sie erfaßt neben PBS noch andere im Harn enthaltene Substanzen, die mit FeCl_3 einen blauen Farbstoff ergeben. Von den Substanzen, die die Bestimmung stören könnten, wurde die p-Oxyphenylbrenztraubensäure (OBS) auf ihre Reaktionsfähigkeit mit Eisen-III-Chlorid geprüft. Es wurden die Extinktion eines Normalurins ohne Zusatz und die Extinktionen des gleichen Urins nach Zusatz verschiedener Konzentrationen OBS verglichen (Tab.9):

mg% OBS (Zusatz zu Urin)	E
0	0.053
10	0.054
20	0.056
30	0.055
40	0.056
50	0.060

Tab.9 Beziehung zwischen Konzentration von p-Oxyphenylbrenztraubensäure (OBS) und Extinktion (E) bei der Methode nach THE u.Mit-
arb. an Urin mit OBS-Zusatz

p-Oxyphenylbrenztraubensäure gibt, wie Tab.9 zeigt, eine schwache Farb-
reaktion mit Eisen-III-Chlorid. Die Extinktion ist jedoch so gering, daß sie,
verglichen mit der Extinktion entsprechender PBS-Konzentrationen, bei der
Bestimmung vernachlässigt werden kann.

Wegen der Unspezifität der Methode wird in der Folge lediglich die Ausschei-
dung FeCl_3 -positiver Substanzen angegeben und in Extinktionsäquivalenten
von PBS ausgedrückt. Welche Schlüsse im Rahmen der vorliegenden Unter-
suchungen von Veränderungen der Ausscheidung FeCl_3 -positiver Substanzen
auf Veränderungen der PBS-Ausscheidung möglich sind, wird im Abschnitt
Diskussion erörtert.

IV. ERGEBNISSE

1. Versuchsanordnung

30 Versuchspersonen wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe umfaßte 10 Patienten mit akuter Hepatitis. Die Diagnose war in allen Fällen durch Anamnese und klinisches Bild sowie durch erhöhtes Serumbilirubin und durch gesteigerte Aktivität der Serumtransaminasen SGOT und SGPT gesichert. -

Die zweite Gruppe enthielt 10 Patienten mit chronischer Hepatitis oder Lebercirrhose. Die Diagnose gründete sich auf Anamnese und klinisches Bild und auf typische Befunde von Serumbilirubin, Transaminasenaktivität, Serumelektrophorese und Bromthaleintest. In acht Fällen war die Diagnose laparoskopisch und histologisch bestätigt. -

Die dritte Gruppe bestand aus 10 Patienten, die sich wegen nichthepatischer Erkrankungen in der Klinik befanden. Anamnese und klinisches Bild gaben keinen Hinweis auf eine bestehende oder früher durchgemachte Lebererkrankung. Eine Leberschädigung wurde in allen Fällen durch Bestimmung des Serumbilirubins und der Transaminasenaktivität sowie durch Elektrophorese (fehlt bei Versuchsperson Bel) und Bromthaleintest ausgeschlossen.

Alle Versuchspersonen erhielten während der Versuchsperiode normale Kost. Am Morgen des zweiten Tages erhielten sie 10 g L-Phenylalanin, eingeührt in etwas Quark, per os. Es wurde der 24-Stunden-Urin über insgesamt drei Tage gesammelt, unter Thymol aufbewahrt und die Tyrosinausscheidung sowie die Ausscheidung der FeCl_3 -positiven Substanzen an jedem der drei Tage gemessen. Außerdem wurde bei einigen Personen jeder Gruppe die Dünnschichtchromatographie der Hydrazone ausgeführt.

Zwei Personen mit akuter Hepatitis und ein Patient mit Lebercirrhose erbrachen innerhalb zwei Stunden nach Verabreichung des Phenylalanins. Bei einer Patientin mit akuter Hepatitis und bei einer lebernormalen Patientin traten am Tag nach der Belastung Durchfälle auf. Diese Personen sind im Kollektiv der 30 Versuchspersonen nicht enthalten.

Die Tab.10 gibt eine Übersicht über die klinisch-chemischen Befunde der untersuchten Personen:

Tab.10 Klinisch-chemische Befunde bei den Versuchspersonen
der drei Gruppen

Akute Hepatitis

	SGOT (mU)	SGPT (mU)	Bilirubin	Elektrophorese
Edl	728	672	9,7	50,0-6,0-6,0-11,0-27,0
Chr	528	560	1,9	51,3-5,3-8,3-12,7-22,4
Goe	320	324	10,0	44,2-6,8-8,4-17,6-23,0
Ber	710	844	9,4	46,5-5,0-6,0-11,5-31,0
Wag	1132	672	38,0	47,0-6,8-5,9-9,3-31,0
Sch	728	672	5,9	49,7-4,9-8,0-11,9-25,5
Naz	261	235	11,6	42,8-5,0-10,2-11,2-30,8
Spe	278	374	3,1	42,0-5,9-8,5-11,9-31,7
Hoe	187	335	10,0	51,0-5,7-6,7-9,9-26,7
Hol	20	69	2,9	51,0-5,8-10,9-15,3-17,0

Chronische Hepatitis und Cirrhose

	SGOT	SGPT	Bilir.	Bromth.	Hist.	Elektrophorese
Bra	167	157	0,7	-	+	44,3-4,4-6,9-12,9-31,5
Erb	483	245	7,0	-	+	38,8-3,0-5,0-11,0-42,2
Kre	48	26	3,5	-	+	34,0-3,0-7,0-7,0-49,0
Wey	544	358	17,5	-	+	46,8-5,5-8,0-9,8-29,9
Pet	23	11	0,8	14,9	+	37,5-6,5-13,5-10,0-32,5
Sta	10	5	0,7	47,0	-	52,5-5,2-7,8-16,2-18,3
Fre	34	33	0,8	61,0	-	43,5-5,2-11,0-12,3-28,0
Lud	63	27	0,8	37,7	+	30,0-3,0-4,0-8,9-54,1
Fel	214	197	3,4	-	+	35,3-3,9-6,8-8,8-45,2
Hed	38	18	0,2	30,0	+	37,5-3,8-6,2-7,8-44,7

Normal

	SGOT	SGPT	Bilir.	Bromth.	Elektrophorese
Fri	11	9	0,3	2,2	52,0-5,0-10,0-12,5-20,5
Gae	10	2	0,3	1,7	52,0-4,2-10,8-12,0-21,0
Moh	11	12	0,6	0,1	44,5-5,5-10,5-12,0-27,5
Ros	15	12	0,4	2,5	51,0-6,0-8,7-15,2-19,1
Mei	8	6	0,1	0,7	51,7-4,5-10,5-13,0-20,3

Tab.10 Fortsetzung

	SGOT	SGPT	Bilir.	Bromth.	Elektrophorese
Keh	5	5	0,7	1,7	58,7-5,0-9,0-13,0-14,3
Tro	7	5	0,5	2,5	29,2-8,9-13,4-16,2-32,3
Met	9	9	0,3	0,9	45,6-5,5-10,2-14,5-24,5
Bel	9	5	0,8	2,5	
Gro	11	7	0,3	2,6	48,8-5,2-11,0-14,2-20,8

2. Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, Tyrosin und von FeCl₃-positiven Substanzen

a) Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure

Die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde bei einigen Probanden jeder Gruppe qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie des Hydrazons untersucht. Ein Beispiel aus jeder Gruppe geben die Abb. 6 - 8. Die Skizzen zeigen, daß p-Oxyphenylbrenztraubensäure beim Gesunden nicht nachweisbar, bei Kranken mit akuter Hepatitis und mit chronischer Hepatitis oder Cirrhose dagegen deutlich nachweisbar ist.

b) Ausscheidung von Tyrosin und von FeCl₃-positiven Substanzen

Tab. 10 gibt die Tyrosinausscheidung und die Ausscheidung der FeCl₃-positiven Substanzen an jedem der drei Versuchstage für die einzelnen Versuchspersonen an. Die Ausscheidung der FeCl₃-positiven Substanzen ist in Extinktionsäquivalenten von Phenylbrenztraubensäure ausgedrückt. Abb.9 zeigt die Mittelwerte der Tyrosinausscheidung an den drei Versuchstagen bei akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Lebercirrhose sowie bei nicht geschädigter Leber. Abb.10 gibt die entsprechenden Werte für die Ausscheidung FeCl₃-positiver Substanzen wieder.

Tab.11 Ausscheidung von Tyrosin und von FeCl_3 -positiven Substanzen an jedem der drei Versuchstage bei den einzelnen Versuchspersonen. Die Ausscheidung der FeCl_3 -positiven Substanzen ist in Extinktions-äquivalenten von Phenylbrenztraubensäure (PBS) ausgedrückt.
M = Mittelwert K = Konfidenzintervall

Akute Hepatitis

	Tyrosin mg/Tag			FeCl_3 -pos.S. als mg PBS/Tag		
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
Edl	19,3	18,1	42,4	48,6	17,9	30,8
Chr	20,6	42,6	10,6	30,6	29,6	27,0
Goe	36,3	27,1	39,3	58,0	36,3	34,4
Ber	44,3	39,0	44,8	54,1	13,5	20,2
Wag	29,7	26,3	32,1	26,6	43,8	15,7
Sch	33,0	38,0	39,3	29,2	15,5	23,1
Naz	20,0	17,3	18,9	32,4	11,1	17,1
Spe	23,2	30,0	23,3	22,7	14,7	8,2
Hoe	13,8	13,1	13,1	37,5	30,2	20,2
Hol	4,3	10,0	4,4			
Z.d.Best.	10	10	10	9	9	9
M	24,4	26,2	26,8	37,7	23,6	21,9
K	8,3			10,6		

Chronische Hepatitis und Cirrhose

	Tyrosin mg/Tag			FeCl_3 -pos.S. als mg PBS/Tag		
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
Bra	3,7	3,8	8,8	4,2	5,9	8,0
Erb	27,4	56,3	19,3	33,8	26,5	21,9
Kre	10,7	22,8	29,5	8,4	10,2	3,2
Wey	25,7	47,3	37,5	45,9	32,6	40,6
Pet	39,8	60,9	52,5	54,6	59,1	60,2
Sta	40,4	42,9	47,3	44,0	48,5	33,4
Fre	18,1	13,0	23,8	13,5	22,4	22,5

wird fortgesetzt

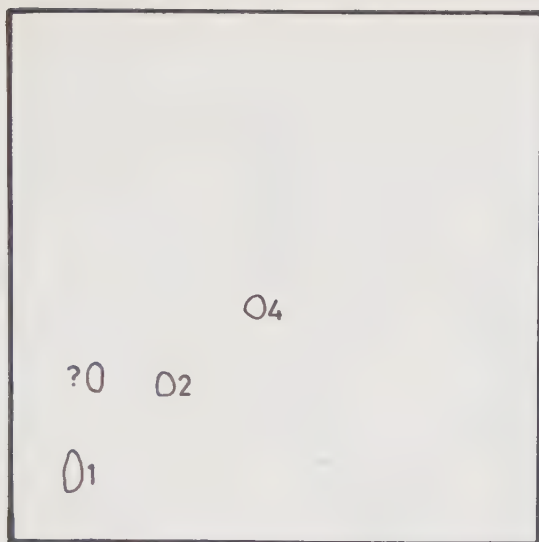


Abb. 6 Ausscheidung von α -Ketosäuren einer nicht leberkranken Versuchsperson, Ausscheidung am Tag der Phenylalaninbelastung: Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Beim Gesunden ist p-Oxyphenylbrenztraubensäure nicht nachweisbar. Die Ziffern auf den Abb. 6-8 bedeuten: 1 α -Ketoglutarensäure, 2 Brenztraubensäure, 3 p-Oxyphenylbrenztraubensäure II, 4 Phenylbrenztraubensäure, 5 p-Oxyphenylbrenztraubensäure I

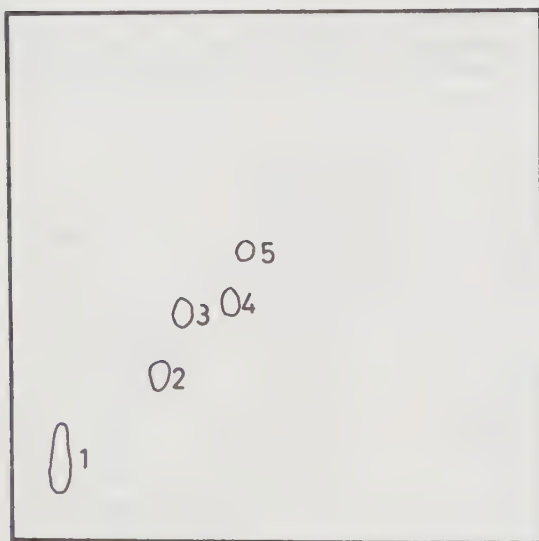


Abb. 7 Ausscheidung von α -Ketosäuren einer Person mit akuter Hepatitis. Ausscheidung am Tag vor Phenylalaninbelastung. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Beim Kranken mit akuter Hepatitis ist p-Oxyphenylbrenztraubensäure deutlich nachweisbar.

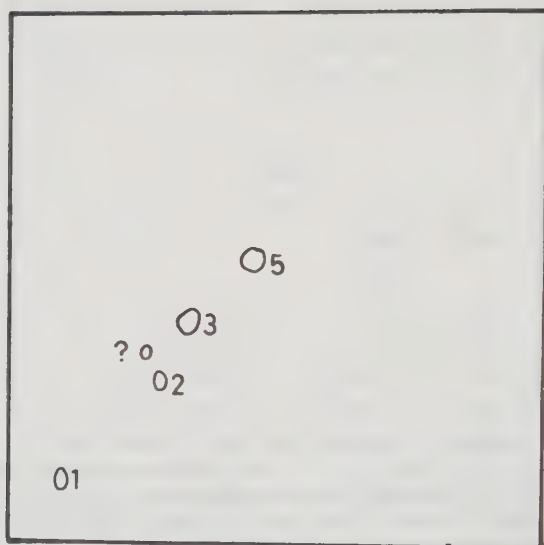


Abb. 8 Ausscheidung von α -Ketosäuren einer Person mit Lebercirrhose, Ausscheidung am Tag nach Phenylalaninbelastung. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Beim Kranken mit Lebercirrhose ist p-Oxyphenylbrenztraubensäure deutlich nachweisbar.

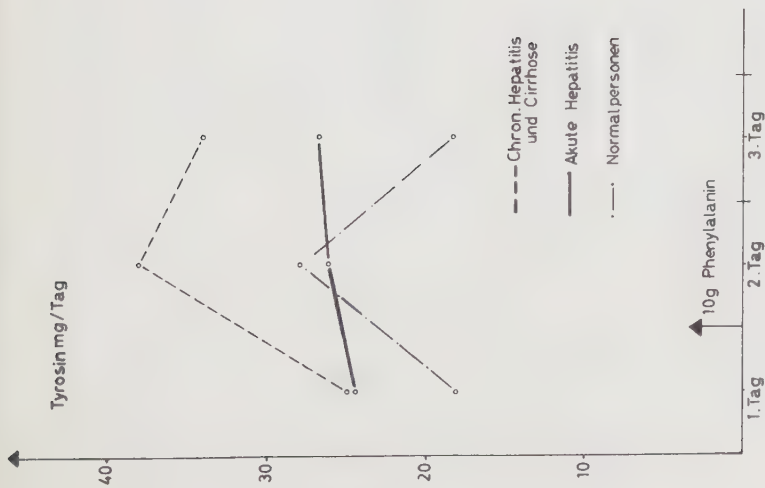


Abb. 9 Mittelwerte der Tyrosinausscheidung an den drei Versuchstagen bei akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Lebercirrhose sowie bei nicht geschädigter Leber. Der Zeitpunkt der Phenylalaninbelastung ist durch einen Pfeil markiert.

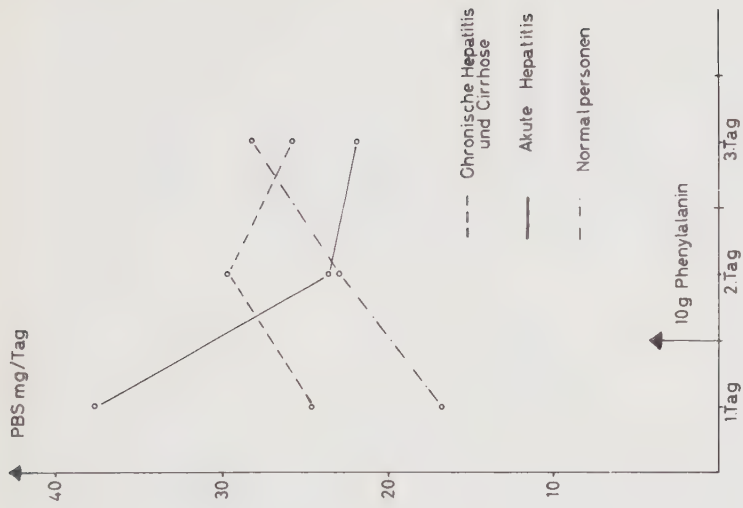


Abb. 10 Mittelwerte der Ausscheidung FeCl_3 -positiver Substanzen an den drei Versuchstagen bei akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Lebercirrhose sowie bei nicht geschädigter Leber. Der Zeitpunkt der Phenylalaninbelastung ist durch einen Pfeil markiert.

Tabelle 11 Fortsetzung

	Tyrosin mg/Tag			FeCl ₃ -pos.S. als mg PBS/Tag		
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
Lud	7,3	7,6	15,5	8,8	9,7	28,3
Fel	25,0	47,2	33,0	8,6	53,0	14,6
Hed	51,9	79,3	74,1			
Z.d.Best.	10	10	10	9	9	9
M	25,0	38,1	34,1	24,6	29,7	25,8
K	9,1			11,5		

Lebergesunde

	Tyrosin mg/Tag			FeCl ₃ -pos.S. in mg PBS/Tag		
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
Fri	20,0	20,8	23,7	25,6	4,5	13,3
Gae	21,1	44,6	20,4	18,2	28,5	23,6
Moh	6,6	16,6	11,3	14,9	11,7	1,4
Ros	34,4	41,8	14,9	28,9	26,1	15,3
Mei	7,3	8,0	14,9	0,0	3,9	13,2
Keh	6,0	26,8	4,2	22,9	30,1	33,1
Tro	22,2	33,1	12,8	18,4	22,0	21,0
Met	25,5	35,7	35,0	9,3	10,7	19,2
Bel	17,4	17,7	10,9	12,8	69,4	114,0
Gro	20,5	34,5	34,8			
Z.d.Best.	10	10	10	9	9	9
M	18,1	28,0	18,3	16,8	23,0	28,2
K	8,1			20,4		

3. Statistische Auswertung

a) Varianzanalyse

Die Auswertung der Daten erfolgt mit der mehrfachen Varianzanalyse. Diese ist ein statistisches Verfahren, das die unabhängige Beurteilung mehrerer in einer Versuchsreihe gleichzeitig wirksamer Einflußfaktoren gestattet. Durch die Varianzanalyse wird die Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert (SAQ)

$$\sum_{ijk} (x_{ijk} - \bar{x})^2$$

zerlegt in die durch die einzelnen Einflußfaktoren bedingten Anteile. Diese werden durch Division durch die Zahl der unabhängigen Werte (Freiheitsgrade, f) normiert, so daß man die sogenannten mittleren Abweichungsquadrate (MAQ) erhält. Für diese MAQ_i lassen sich die Erwartungswerte $E [MAQ_i]$ in Abhängigkeit vom jeweiligen Modell ableiten. Als Test wird geprüft, ob das mittlere Abweichungsquadrat des jeweiligen Einflußfaktors gesichert größer ist als der sich aus den $E [MAQ_i]$ ergebende Bezugswert. Der Einfluß eines Faktors gilt als gesichert, wenn der Quotient MAQ_i/MAQ_j (MAQ_j = Bezugswert) größer ist als der Wert der F-Verteilung mit den Freiheitsgraden von MAQ_i und MAQ_j und der Irrtumswahrscheinlichkeit ($p = 0,05$ bzw. $p = 0,01$).

b) Versuchsmodell

Bei der vorliegenden Versuchsreihe lassen sich innerhalb der Krankheitsgruppen zwei Einflußfaktoren abgrenzen, die durch die Versuchspersonen und durch die Ausscheidung an den verschiedenen Tagen charakterisiert sind. Für alle Bestimmungen liegen zwei Meßwerte vor, die jedoch nur die Abgrenzung des Bestimmungsfehlers gestatten. Folgende Varianzanalyse ergibt sich:

Varianz	$E [MAQ]$
Zwischen Versuchspersonen	$\sigma'^2 + 2\sigma^2 + 6\sigma_1^2$
Zwischen Tagen	$\sigma'^2 + 2\sigma^2 + 2\sigma_{12}^2 + 20\sigma_2^2$
Restvarianz	$\sigma'^2 + 2\sigma^2 + 2\sigma_{12}^2$
Zwischen Doppelbestimmungen	σ'^2

c) Auswertung der Daten

α) Tyrosinausscheidung

Normalpersonen:

Varianz	SAQ	f	MAQ	F	P
Zw. Versuchspers.	4002,41	9	444,71	4,1	< 0,01
Zw. Tagen	1274,63	2	637,32	5,9	= 0,01
Restvarianz	1946,11	18	108,12		
Zw. Doppelbest.	53,57	30	1,78		

Akute Hepatitis:

Zw. Versuchspers.	6487,96	9	720,88	6,1	< 0,001
Zw. Tagen	60,10	2	30,05	-	
Restvarianz	2149,71	18	119,43		
Zw. Doppelbest.	40,17	30			

Chronische Hepatitis und Cirrhose:

Zw. Versuchspers.	20119,77	9	2235,53	15,4	< 0,001
Zw. Tagen	1804,04	2	902,02	6,2	< 0,01
Restvarianz	2625,39	18	145,86		
Zw. Doppelbest.	34,55	30	1,15		

β) Ausscheidung FeCl₃-positiver Substanzen

Normalpersonen:

Zw. Versuchspers.	14978,37	8	1872,30	2,85	< 0,05
Zw. Tagen	1186,10	2	593,05	-	
Restvarianz	10480,34	16	655,02		
Zw. Doppelbest.	26734,67	27	3,33		

Akute Hepatitis:

Zw. Versuchspers.	2999,93	8	374,99	2,1	-
Zw. Tagen	2730,56	2	1365,28	7,8	< 0,005
Restvarianz	2800,82	16	175,05		
Zw. Doppelbest.	72,54	27	2,69		

Chronische Hepatitis und Cirrhose:

Zw. Versuchspers.	14182,81	8	1772,85	8,6	< 0,001
Zw. Tagen	256,14	2	128,07	-	
Restvarianz	3325,74	16	207,86		
Zw. Doppelbest.	24,76	27	0,92		

d) Konfidenzgrenzen

Nach BROWNLEE ergeben sich für den Erwartungswert der Differenz zweier Mittelwerte folgende Konfidenzgrenzen:

$$K = (\bar{x}_i - \bar{x}_j) \pm t_{0,01}(60) \cdot \sqrt{2 \text{ MAQR}/20}$$

$t_{0,01}(60)$ = Wert der t-Verteilung mit 60 Freiheitsgraden und der Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,01$.

Ist der Unterschied zweier Mittelwerte größer als das Konfidenzintervall, so kann er als gesichert angesehen werden. Die Konfidenzintervalle für die Ausscheidung von Tyrosin und FeCl_3 -positiver Substanzen in den einzelnen Gruppen wurden berechnet und in der Ergebnistabelle unter den Mittelwerten aufgeführt.

Danach liegt die Tyrosinausscheidung bei Normalen am Belastungstag gesichert höher als am ersten und am dritten Tag. Kranke mit chronischer Hepatitis oder Cirrhose scheiden am Belastungstag und am Tag nach Belastung gesichert mehr Tyrosin aus als am Vortag. Bei der akuten Hepatitis gibt es keinen gesicherten Unterschied zwischen der Tyrosinausscheidung an allen drei Tagen.

Die Ausscheidung FeCl_3 -positiver Substanzen zeigt bei Gesunden und Kranken mit chronischer Hepatitis und Cirrhose keine Unterschiede an den drei Tagen. Bei den Patienten mit akuter Hepatitis liegt sie am Tag vor Belastung gesichert höher als an den beiden folgenden Tagen.

e) Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen

Es wurde außerdem mit mehrfacher Varianzanalyse bei partiell hierarchischer Anordnung untersucht, ob zwischen den Mittelwerten der Gruppen Unterschiede bestehen. Solche Unterschiede ließen sich nicht nachweisen. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß die Streuung zwischen den Versuchspersonen mit chronischer Hepatitis oder Cirrhose wesentlich größer ist als zwischen denen der anderen Gruppen.

V. DISKUSSION

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die Ausscheidung von Metaboliten des Phenylalanin- und Tyrosinstoffwechsels im Urin Gesunder und Leberkranker vor und nach peroraler Phenylalaninbelastung bestimmt mit dem Ziel, Hinweise auf die Lokalisation von Störungen im Abbau dieser beiden Aminosäuren zu gewinnen.

Eine Störung des Tyrosinabbaues bei Lebererkrankungen auf der Stufe der p-Oxyphenylbrenztraubensäure ist seit den Untersuchungen von FELIX und TESKE bekannt. GROS und KIRNBERGER konnten dies durch umfangreiche klinische Versuche mit verbesserter Methodik bestätigen. In Übereinstimmung damit ließ sich bei den eigenen Untersuchungen p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Urin von Kranken mit akuter Hepatitis und mit chronischer Hepatitis oder Lebercirrhose sowohl vor als auch nach Phenylalaninbelastung qualitativ nachweisen. Bei Normalpersonen war hingegen dieser Metabolit unter gleichen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar.

Verschiedene Autoren haben über Veränderungen des Serumspiegels von Phenylalanin und Tyrosin bei Lebererkrankungen berichtet (Literatur bei GEROK 1963). Die Befunde waren nicht einheitlich, vorwiegend aus methodischen Gründen. GEROK fand mit säulenchromatographischer Methode eine signifikante Erhöhung von Phenylalanin und Tyrosin lebergeschädigter Personen. - Die Ausscheidung von Tyrosin im Urin Leberkranker ist ebenfalls mehrfach untersucht worden. MÜTING und WORTMANN (Papierchromatographie) geben eine mäßige Erhöhung des Tyrosins im Urin Lebergeschädigter an. KNAUFF u. Mitarb. (Hochspannungselektrophorese + Papierchromatographie) berichten über vermehrte Tyrosinausscheidung bei Lebererkrankungen. 50% der von DUNN u. Mitarb. (mikrobiologische Methode) untersuchten Patienten schießen mehr Tyrosin aus als die gesunden Vergleichspersonen. Bei zwei Cirrhotikern von LAWRIE (enzymatische Methode) lag die Tyrosinausscheidung gering über dem bei Normalen beobachteten Höchstwert.

Die Deutung der eigenen Ergebnisse geht zweckmäßigerweise davon aus, daß die Ausscheidung einer Verbindung in den Urin von vier wesentlichen Faktoren beeinflusst wird:

1. Zufuhr der Verbindung oder ihrer Vorstufen von außen
 - a) Gehalt der Nahrung
 - b) Größe der Resorption
2. Bildung der Verbindung oder ihrer Vorstufen aus anderen Verbindungen

innerhalb des Körpers.

3. Abbau der Verbindung.

4. Ausscheidung der Verbindung durch die Niere.

Die Zusammensetzung der Nahrung war für alle Versuchspersonen gleich. Ebenso wurden alle Probanden am zweiten Tag mit Phenylalanin belastet. Die Dosis von 10 g erscheint hoch. Man muß jedoch annehmen, daß wegen der Aminosäurenimbalance (eine Aminosäure wird, allein verabreicht, schlechter resorbiert als in einem Aminosäurengemisch) ein erheblicher Teil nicht ins Pfortaderblut gelangte. Untersuchungen über die tatsächliche Resorptionsgröße wurden nicht angestellt. Unter der Voraussetzung gleicher Resorptionsbedingungen bei Gesunden und Leberkranken waren hinsichtlich der Phenylalanin- und Tyrosinzufuhr alle Versuchspersonen gleichen Bedingungen unterworfen.

Bei keiner der untersuchten Personen bestand ein Hinweis auf einen Nierenschaden. Die Versuchspersonen waren deshalb auch hinsichtlich des Faktors "Ausscheidung" vergleichbar. Bei der Interpretation der Ergebnisse waren jedoch die Befunde von DOOLAN u. Mitarb. zu berücksichtigen. Diese Autoren bestimmten die tubuläre Rückresorption verschiedener Aminosäuren vor und nach Belastung mit Aminosäuregemischen und fanden für Tyrosin keinen gesicherten Unterschied zwischen "endogener Clearance" und Clearance nach Belastung. Diese Tatsache läßt im Falle vermehrter Ausscheidung den Schluß auf einen erhöhten Blutspiegel zu. Unveränderte Ausscheidung dagegen ist nicht gleichbedeutend mit unveränderter Konzentration im Blut. Mit dieser Einschränkung kann man bei der vorliegenden Versuchsanordnung das unterschiedliche Verhalten der untersuchten Gruppen allein durch die Unterschiede in den Faktoren "Bildung" und "Abbau" zu erklären versuchen.

Die eigenen Bestimmungen der Tyrosinausscheidung nicht belasteter Gesunder (6,0 bis 34,4 mg/Tag, Mittelwert 18,1 mg/Tag) lagen in der Größenordnung der Ergebnisse anderer Untersucher (EVERED, WOODSON u. Mitarb., LAWRIE). STEIN hat über bedeutend höhere Werte berichtet (15 bis 49 mg/Tag, Mittelwert 35 mg/Tag). Die Spontanausscheidung sowohl der Patienten mit akuter Hepatitis als auch der mit chronischer Hepatitis und Lebercirrhose lag nicht gesichert höher als die der Gesunden. Die Angaben in der Literatur über eine Erhöhung der Tyrosinausscheidung bei Leberkranken sind teils aus methodischen (MÜTING und WORTMANN, KNAUFF u. Mitarb.), teils aus statistischen Gründen (DUNN u. Mitarb., LAWRIE) nicht beweiskräftig. Der bei Leberkranken gesichert erhöhte Tyrosinspiegel im Serum führt also nicht zu einer vermehr-

ten Ausscheidung von Tyrosin im Urin. Die Situation des leberkranken Organismus entspricht offenbar der des mit Aminosäuren belasteten gesunden Organismus in den Versuchen von DOOLAN u. Mitarb.

Die Steigerung der Tyrosinausscheidung bei Gesunden nach Belastung mit Phenylalanin hat zur Voraussetzung, daß der Tyrosinblutspiegel im Gefolge der Belastung ebenfalls stark ansteigt. Das Tyrosin im Blut muß dabei Konzentrationen erreichen, die die von DOOLAN u. Mitarb. erzeugten übersteigen. Das Gleiche gilt für die Patienten mit chronischen Lebererkrankungen. Bei dieser Gruppe ist ein langanhaltender starker Tyrosinanstieg im Blut Bedingung für den gegenüber der Normalgruppe längerwährenden Anstieg der Tyrosinausscheidung nach Phenylalaninbelastung. Dagegen ist es nicht gestattet, bei der akuten Hepatitis von der unveränderten Tyrosinausscheidung auf einen gleichbleibenden Tyrosinblutspiegel zu schließen. Nach den Untersuchungen von GEROK (1963) sowie KNAUFF u. Mitarb. ist es sogar wahrscheinlich, daß der Tyrosinspiegel im Blut auch in dieser Gruppe unter der Belastung zunimmt, jedoch nur so weit, daß eine vermehrte glomeruläre Filtration durch gesteigerte tubuläre Rückresorption kompensiert werden kann und somit keine vermehrte Ausscheidung resultiert.

Als Hauptursache für den Anstieg bei Normalen ist die vermehrte Bildung aus Phenylalanin anzusehen. Ob daneben noch ein verminderter Abbau, z.B. infolge Enzymhemmung durch Substratüberschuß, eine Rolle spielt, ist nicht zu entscheiden. Tierexperimentelle Befunde sprechen dagegen: Tyrosinbelastung bei gesunden Ratten (LIN und KNOX) und bei Meerschweinchen (KNOX und GOSWAMI) führte zu gesteigertem Abbau des Tyrosins durch Transaminierung. Ob diese Befunde auf den Menschen übertragbar sind, ist allerdings fraglich, denn gleichzeitig wurde durch die Tyrosingabe eine Hemmung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure-Oxydase herbeigeführt. Beim gesunden Menschen dagegen ließ sich p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Urin nach Tyrosingabe (GROS und KIRNBERGER) oder nach Phenylalanin (eigene Befunde) nicht nachweisen.

Das Verhalten der Tyrosinausscheidung bei Kranken mit akuter Hepatitis legt nahe, eine Störung der Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin anzunehmen. Um einen vollständigen Ausfall der Reaktion dürfte es sich dabei nicht handeln, es müßte sonst eine Stoffwechselsituation wie bei der Föllingschen Erkrankung entstehen. Phenylbrenztraubensäure müßte im Harn nachweisbar sein. Das ist nicht der Fall (s.u.). Wahrscheinlicher ist, daß die Bildung von Tyrosin nicht völlig unterbrochen ist, sondern nur verzögert ab-

läuft. Auch eine verminderte "Kapazität" des Tyrosinabbaues, wie sie bei akuter Hepatitis analog zur chronischen Hepatitis und Lebercirrhose möglicherweise vorliegt, würde ausreichen, das im Vergleich zu belasteten Gesunden geringe Tyrosinangebot abzubauen. Der Tyrosinblutspiegel würde dabei unterhalb jenes Wertes bleiben, bei dem eine nahezu vollständige tubuläre Rückresorption nicht mehr möglich ist. Dies schließt zusätzliche Störungen an anderen Reaktionen des Tyrosinabbaues, z.B. die gesichert verminderte Oxydation der p-Oxyphenylbrenztraubensäure (GROS und KIRNBERGER), nicht aus. Die Hemmung der Transaminierung des Tyrosins liegt wegen des auch ohne Belastung erhöhten Tyrosinblutspiegels im Bereich des Möglichen. Nach dem Verhalten der Tyrosinausscheidung ist anzunehmen, daß diese Störungen bei der vorliegenden Versuchsanordnung nicht zur Auswirkung gelangen. Gleiche Untersuchungen mit der Gabe von Tyrosin anstelle von Phenylalanin könnten Klärung bringen.

Die bei Kranken mit chronischer Hepatitis und Lebercirrhose gesichert höhere Tyrosinausscheidung am Tag der Phenylalaninbelastung und am folgenden Tag im Vergleich zum Vortag ohne Belastung könnte Ausdruck der nicht oder nur wenig gestörten Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin sein. Wäre dies der einzige Mechanismus, der zur vermehrten Tyrosinausscheidung führt, so müßten sich die Probanden dieser Gruppe wie die Normalpersonen verhalten. Bei den Kranken mit chronischer Hepatitis und Lebercirrhose kehrt jedoch die Tyrosinausscheidung am Tag nach der Belastung nicht zum Ausgangswert zurück wie bei den Gesunden, die Ausscheidung bleibt vielmehr gesichert höher als vor Belastung. Diese Befunde weisen darauf hin, daß der Tyrosinabbau an weiteren Stellen gestört ist, wie dies für die Gruppe der akuten Hepatitis bereits diskutiert wurde. Im Gegensatz zur akuten Erkrankung kommen diese Störungen bei chronischer Hepatitis und Cirrhose besonders zur Geltung, da vergleichsweise mehr Tyrosin aus Phenylalanin entsteht. Eine andere Erklärung der Befunde ergibt sich, wenn man annimmt, daß bei chronischer Hepatitis und Cirrhose die Tyrosinbildung aus Phenylalanin wie bei akuter Hepatitis zwar vermindert, jedoch die Störung im weiteren Tyrosinabbau dominierend ist, so daß trotz verminderter Bildung von Tyrosin ein "Anstau" dieser Aminosäure resultiert.

Zusammenfassend machen die Ausscheidungsmuster der drei untersuchten Gruppen folgende Deutung möglich:

1. Bei den lebergesunden Kontrollpersonen führt die Phenylalaninbelastung zur kurzfristigen Erhöhung des Tyrosins im Blut und im Urin infolge Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin.

2. Bei Personen mit akuter Hepatitis ist die Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin gestört. Die Phenylalaninbelastung hat keinen Einfluß auf die Tyrosinausscheidung.
3. Bei Personen mit chronischer Hepatitis oder Lebercirrhose liegen vor allem Störungen im Abbau des Tyrosins vor. Die Phenylalaninbelastung führt zu protrahiertem Anstieg der Tyrosinausscheidung, wobei die Tyrosinbildung aus Phenylalanin normal oder - wie bei akuter Hepatitis - gestört sein kann.

Die Ausscheidung der Phenylbrenztraubensäure im Urin hat im Zusammenhang mit der Fölling'schen Erkrankung immer wieder Interesse gefunden. Über die Phenylbrenztraubensäureausscheidung bei Lebererkrankungen liegen bisher keine Untersuchungen vor. Beachtung im Rahmen dieser Arbeit verdienen die Tierversuche GOLDSTEINs: Er verabreichte gesunden Ratten große Mengen (0,5 - 1,0 g/kg Körpergewicht) Phenylalanin intraperitoneal und konnte damit eine serumchemische Konstellation erzeugen, wie sie für die Fölling'sche Erkrankung typisch ist. Unter der Belastung schieden die Ratten Phenylbrenztraubensäure in großer Menge aus.

Die Methode von THE u. Mitarb. erfaßt neben der Phenylbrenztraubensäure noch andere im Harn enthaltene FeCl_3 -positive Substanzen. Man kann mit ihr die Phenylbrenztraubensäure im Urin nicht spezifisch bestimmen, jedoch wäre im Falle eines Anstiegs der FeCl_3 -positiven Substanzen nach Phenylalaninbelastung mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine gesteigerte Phenylbrenztraubensäureausscheidung zu schließen. Ein Anstieg der FeCl_3 -positiven Substanzen ließ sich bei keiner der drei Gruppen nachweisen. Die Belastung führt also weder bei Gesunden noch bei Leberkranken zu vermehrter Phenylbrenztraubensäureausscheidung. In der Gruppe der akuten Hepatitis, bei der man am ehesten mit einem Anstieg hätte rechnen dürfen (s.o.), fand sich sogar ein gesichert niedrigerer Wert am Belastungstag und am folgenden Tag verglichen mit der Ausscheidung am Tag der Belastung. Eine Erklärung für dieses Verhalten läßt sich nicht geben. Die vorliegenden Untersuchungen geben keinen Aufschluß darüber, in welchem Umfang der Abbauweg von Phenylalanin zu Phenylacetylglutamin bei Gesunden und Leberkranken benutzt wird.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zum Nachweis von Störungen im Stoffwechsel von Phenylalanin und Tyrosin wurde die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, Tyrosin und von FeCl_3 -positiven Substanzen, zu denen die Phenylbrenztraubensäure gehört, im Urin Gesunder und Leberkranker vor und nach peroraler Belastung mit L-Phenylalanin untersucht.
2. p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde mittels Dünnschichtchromatographie qualitativ nachgewiesen. Tyrosin wurde mit der enzymatischen Methode nach TASHIAN in Kombination mit der kolorimetrischen Methode von CERIOTTI und SPANDRIO, die FeCl_3 -positiven Substanzen mit der Methode nach THE u. Mitarb. quantitativ bestimmt.
3. p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde im Urin von Patienten mit akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis und Lebercirrhose nachgewiesen. Im Urin von Lebergesunden war diese Substanz nicht nachweisbar. - Die Spontanausscheidung von Tyrosin zeigte keine statistisch gesicherten Unterschiede bei Gesunden und Leberkranken. Auch am Belastungstag und dem darauffolgenden Tag ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der mittleren Tyrosinausscheidung bei Gesunden und Leberkranken. Innerhalb der Gruppe der Gesunden stieg die Tyrosinausscheidung am Belastungstag signifikant an und kehrte am Tag nach Belastung zum Ausgangswert zurück. Die Personen mit chronischer Hepatitis und Lebercirrhose schieden am Belastungstag und am folgenden Tag gesichert mehr Tyrosin aus als am Vortag. Bei den Kranken mit akuter Hepatitis blieb die Tyrosinausscheidung von der Phenylalaninbelastung unbeeinflusst. - Eine erhöhte Ausscheidung FeCl_3 -positiver Substanzen nach Phenylalaninbelastung war in keiner der drei Gruppen nachweisbar.
4. Das unterschiedliche Verhalten der Tyrosinausscheidung bei Kranken mit akuter Hepatitis, chronischer Hepatitis oder Lebercirrhose und bei Lebergesunden wird in dem Sinne gedeutet, daß bei akuter Hepatitis vorwiegend die Tyrosinbildung aus Phenylalanin, bei chronischer Hepatitis und Lebercirrhose vorwiegend der Tyrosinabbau gestört ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Ambrose, A.M., F.W.Power, C.P.Sherwin:
Further Studies on the Detoxication of Phenylacetic Acid.
J.Biol.Chem. 101, 669 (1933).
- 2) Berry, J.P., L.I.Woolf:
Estimation of Phenylpyruvic Acid.
Nature 169, 202 (1952).
- 3) Bollmann, J.L., F.C.Mann:
The Effect of Removal of the Liver on the Formation of Ammonia.
Amer.J.Physiol. 92, 92 (1930).
- 4) Brownlee, K.A.:
Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering.
New York: John Wiley & Sons, 1961.
- 5) Bruns, F.H., G.L.Haberland, K.I.Altmann:
Bildung von Hippursäure aus Phenylalanin-3-C¹⁴ und Phenylserin-3-C¹⁴
im Organismus der Ratte.
Biochem.Zschr. 331, 446 (1959).
- 6) Bürgi, W., J.P.Colombo, R.Richterich:
Dünnschichtchromatographie von säure- und ätherlöslichen DNP-Amino-
säuren im Urin.
Klin.Wschr. 43, 1202 (1965).
- 7) Canellakis, Z.N., P.P.Cohen:
Kinetic and Substrate Specificity Study of Tyrosine- α -Ketoglutaric Acid
Transaminase.
J.Biol.Chem. 222, 63 (1956).
- 8) Cavallini, D., N.Frontali, G.Toschi:
Ketoacid Content of Human Blood and Urine.
Nature 164, 792 (1949).
- 9) Ceriotti, G., L.Spandrio:
Colorimetric Determination of Tyrosine.
Biochem.J. 66, 607 (1957).
- 10) Grandall, D.I.:
Homogentisic Acid Oxidase.
J.Biol.Chem. 212, 565 (1955).
- 11) Grandall, D.I., D.N.Halikis:
Homogentisic Acid Oxidase.
J.Biol.Chem. 208, 629 (1954).

- 12) Cremer, H. D., H. Berger:
Beitrag zur Leberfunktionsprobe nach Felix.
Klin. Wschr. 24/25, 222 (1947).
- 13) Doolan, P. D., H. A. Harper, M. E. Hutchin, E. L. Alpen:
The Renal Tubular Response to Amino Acid Loading.
J. Clin. Invest. 35, 888 (1956).
- 14) Doolan, P. D., H. A. Harper, M. E. Hutchin, W. W. Shreeve:
Renal Clearance of Eighteen Individual Amino Acids in Human Subjects.
J. Clin. Invest. 34, 1247 (1955).
- 15) Dunn, M. S., S. H. Akawie, H. L. Yeh, H. Martin:
Urinary Excretion of Amino Acids in Liver Disease.
J. Clin. Invest. 29, 302 (1950).
- 16) Edwards, S. W., W. E. Knox:
Homogentisate Metabolism: The Isomerisation of Maleylacetoacetate
by an Enzyme which Requires Glutathione.
J. Biol. Chem. 220, 79 (1956).
- 17) Embden, G., K. Baldes:
Über den Abbau von Phenylalanin im tierischen Organismus.
Biochem. Zschr. 55, 301 (1913).
- 18) Evered, D. F.:
The Excretion of Amino Acids by the Human.
Biochem. J. 62, 416 (1956).
- 19) Falta, W., L. Langstein:
Die Entstehung von Homogentisinsäure aus Phenylalanin.
Zschr. physiol. Chem. 37, 513 (1903).
- 20) Felix, K., R. Teske:
Abbau der p-Oxyphenylbrenztraubensäure und Leberfunktion.
Zschr. physiol. Chem. 267, 173 (1941).
- 21) Fölling, A.:
Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoff-
wechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität.
Zschr. physiol. Chem. 227, 169 (1934).
- 22) Frommerz, K., L. Hermanns:
Über den Abbau der aromatischen Aminosäuren im Tierkörper.
Zschr. physiol. Chem. 91, 194 (1914).
- 23) Gerngross, O., K. Voss, H. Herfeld:
Über eine hochempfindliche, streng tyrosinspezifische Farbreaktion auf
p-substituierte Phenole. Der Tyrosingehalt verschiedener Proteine, ins-
besondere von Kollagen und Gelatine.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66, 435 (1933).

- 24) Gerok, W.:
Untersuchungen zum Aminosäurenstoffwechsel bei Lebererkrankungen.
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 68, 523 (1962).
- 25) Gerok, W.:
Quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Serum bei Erkrankungen
der Leber.
Dtsch. med. Wschr. 88, 1188 (1963).
- 26) Gerok, W.:
unveröffentlicht.
- 27) Gerok, W., P. Bornhäuser:
unveröffentlicht.
- 28) Gerok, W., R. Hochmiller:
Unveröffentlicht.
- 29) Goldstein, F. B.:
Biochemical Studies on Phenylketonuria.
J. Biol. Chem. 236, 2656 (1961).
- 30) Grau, C. R., R. Steele:
Phenylalanine und Tyrosine Utilization in Normal and Phenylalanine-
deficient Rats.
J. Nutrit. 53, 59 (1954).
- 31) Gros, H., E. J. Kirnberger:
Spontanausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn.
Klin. Wschr. 32, 115 (1954).
- 32) Kaufmann, S.:
The Enzymatic Conversion of Phenylalanine to Tyrosine.
J. Biol. Chem. 226, 511 (1957).
- 33) Kaufman, S.:
A New Cofactor Required for the Enzymatic Conversion of Phenylalanine
Tyrosine.
J. Biol. Chem. 230, 931 (1958).
- 34) Kaufman, S.:
Studies on the Mechanism of the Enzymatic Conversion of Phenylalanine
to Tyrosine.
J. Biol. Chem. 234, 2677 (1959).
- 35) Kenney, F. T.:
Properties of Partially Purified Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase
from Rat Liver.
J. Biol. Chem. 234, 2707 (1959).

- 36) Keup, W.:
Eine quantitative Mikromethode zur Bestimmung von Phenylbrenztraubensäure.
Biochem.Zschr. 326, 14 (1955).
- 37) Kirnberger, E.:
Eine einfache colorimetrische Bestimmung der Para-oxyphenylbrenztraubensäure im Harn und ihre Bedeutung für die Leberfunktionsprobe mit Testacid.
Klin.Wschr. 27, 48 (1949).
- 38) Knauff, H.G., H.Selmair, A.Reitlinger:
Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Harn und Blutplasma von Gesunden und Leberkranken.
Klin.Wschr. 38, 812 (1960).
- 39) Knox, W.E., S.W.Edwards:
The Properties of Maleylacetoacetate, the Initial Product of Homogentisate Oxidation in Liver.
J.Biol.Chem. 216, 489 (1955).
- 40) Knox, W.E., M.N.D.Goswami:
The Mechanism of p-Hydroxypyruvate Accumulation in Guinea Pigs Fed Tyrosine.
J.Biol.Chem. 235, 2662 (1960).
- 41) Kropp, K., K.Lang:
Eine colorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Phenylbrenztraubensäure im Harn.
Klin.Wschr. 33, 482 (1955).
- 42) La Du, B.N., D.M.Greenberg:
The Tyrosine Oxidation System of Liver.
J.Biol.Chem. 190, 245 (1951).
- 43) La Du, B.N., V.G.Zannoni:
Further Studies on the Oxidation of p-Hydroxyphenylpyruvic Acid.
J.Biol.Chem. 219, 273 (1956).
- 44) La Du, B.N., V.G.Zannoni, L.Laster, J.E.Seegmiller:
The Nature of the Defect in Tyrosine Metabolism in Alcaptonuria.
J.Biol.Chem. 230, 251 (1958).
- 45) Lawrie, N.R.:
The Excretion of L(-)-Tyrosine in Urine.
Biochem.J. 41, 41 (1947).

- 46) Le May-Knox, M., W.E.Knox:
The Oxidation in Liver of L-Tyrosine to Acetoacetate through p-Hydroxy-phenylpyruvate and Homogentisic Acid.
Biochem.J. 49, 686 (1951).
- 47) Leonhardi, G., I.v.Glasenapp, K.Felix:
Nachweis und Bestimmung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure und des freien Phenols im Harn.
Zschr.physiol.Chem. 286, 19 (1950).
- 48) Lin, E.C.C., W.E.Knox:
Specificity of the Adaptive Response of Tyrosine α -Ketoglutarate Transaminase in the Rat.
J.Biol.Chem. 233, 1186 (1958).
- 49) Mann, F.C., T.B.Magath:
The Nitrogen Constituents of the Blood Following Removal of the Liver.
Amer.J.Physiol. 55, 286 (1921).
- 50) Mason, M.F.:
Observation on Locus of Deamination.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 37, 111 (1937).
- 51) Medes, G.:
A new Error of Tyrosine Metabolism: Tyrosinosis.
The Intermediary Metabolism of Tyrosine and Phenylalanine.
Biochem.J. 26, 917 (1932).
- 52) Meister, A.:
Biochemistry of the Amino Acids.
New York: Academic Press, 1965.
- 53) Meister, A.:
Metabolism of 3,5-Diketohexanoic Acid and its γ -Lactone by Tissue Homogenates.
J.Biol.Chem. 178, 577 (1949).
- 54) Meister, A., J.P.Greenstein:
Enzymatic Hydrolysis of 2,4-Diketo-Acids.
J.Biol.Chem. 175, 573 (1948).
- 55) Mitoma, C.:
Studies on Partially Purified Phenylalanine Hydroxylase.
J.Biol.Biophys. New York 60, 476 (1956).
- 56) Moldave, K., A.Meister:
Synthesis of Phenylacetylglutamine by Human Tissue.
J.Biol.Chem. 229, 463 (1957).

- 57) Moss, A.R., R.Schoenheimer:
The Conversion of Phenylalanine to Tyrosine in Normal Rats.
J.Biol.Chem. 135, 415 (1940).
- 58) Müting, D., V.Wortmann:
Über den Aminosäurehaushalt bei Leberkrankheiten.
Dtsch.Med.Wschr. 81, 1853 (1956).
- 59) Neubauer, O., W.Falta:
Über das Schicksal einiger aromatischer Säuren bei der Alkaptonurie.
Zschr.physiol.Chem. 42, 81 (1904).
- 60) Ottaway, J.H.:
A Colorimetric Method for the Estimation of Tyrosine.
Biochem.J. 68, 239 (1958).
- 61) Penrose, L., J.H.Quastel:
Metabolic Studies in Phenylketonuria.
Biochem.J. 31, 266 (1937).
- 62) Raydin, R.G., D.I.Crandall:
The Enzymatic Conversion of Homogentisic Acid to 4-Fumarylacetoacetic Acid.
J.Biol.Chem. 189, 137 (1951).
- 63) Rokitsansky, G.:
A Manual of Pathological Anatomy, Vol.II.
Philadelphia: Blanchard and Lea 1855.
- 64) Schepartz, B.:
Transamination as an Initial Step in Tyrosine Metabolism.
J.Biol.Chem. 193, 293 (1951).
- 65) Schepartz, B., S.Gurin:
The Intermediary Metabolism of Phenylalanine Labeled with Radioactive Carbon.
J.Biol.Chem. 180, 663 (1949).
- 66) Schimassek, H., W.Gerok:
Control of the Levels of Free Amino Acids in Plasma by the Liver.
Biochem.Zschr. 343, 407 (1965).
- 67) Schreier, K., K.I.Altman, L.H.Hempelmann:
Metabolism of Benzoic Acid in Normal and Irradiated Rats.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 87, 61 (1954).
- 68) Stein, W.H.:
A Chromatographic Investigation of the Amino Acid Constituents of Normal Urine.
J.Biol.Chem. 201, 45 (1953).

- 69) Stein, W.H., S. Moore:
The Free Amino Acids of Human Blood Plasma.
J. Biol. Chem. 211, 915 (1954).
- 70) Tashian, R.E.:
Determination of L-Tyrosine as Tyramine in Urine.
Clin. Chem. 3, 106 (1957).
- 71) The, T.P., P. Fleury, C.L. Vink:
Determination of Phenylpyruvic Acid in the Urine of Patients with Oligo-
phrenia phenylpyruvica.
Clin. Chim. Acta 2, 424 (1957).
- 72) Udenfriend, S., J.R. Cooper:
The Enzymatic Conversion of Phenylalanine to Tyrosine.
J. Biol. Chem. 194, 503 (1952).
- 73) Udenfriend, S., J.R. Cooper:
The Chemical Estimation of Tyrosine and Tyramine.
J. Biol. Chem. 196, 227 (1952).
- 74) Van Slyke, D.D., G.E. Cullen, F.C. Lean:
The Formation of Urea in the Liver.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 12, 93 (1915).
- 75) Wegner, E.:
Die quantitative Bestimmung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn.
Klin. Wschr. 28, 347 (1950).
- 76) Weinhouse, S., R.H. Millington:
Ketone Body Formation from Tyrosine.
J. Biol. Chem. 175, 995 (1948).
- 77) Weinhouse, S., R.H. Millington:
Ketone Body Formation from Tyrosine.
J. Biol. Chem. 181, 645 (1949).
- 78) Williams, J.N., A. Sreenivasan:
A Study of the Cofactors Required by the Tyrosine Oxidase System of
Liver.
J. Biol. Chem. 203, 109 (1953).
- 79) Williams, J.N., A. Sreenivasan:
Further Studies on the Cofactors of the Liver Tyrosine Oxidase System.
J. Biol. Chem. 203, 605 (1953).
- 80) Woodson, H.W., S.W. Hier, J.D. Salomon, O. Bergeim:
Urinary Excretion of Amino Acids by Human Subjects on Normal Diets.
J. Biol. Chem. 172, 613 (1948).

- 81) Zannoni, V.G., B.N. La Du:
Studies on the Defect in Tyrosine Metabolism in Scorbutic Guinea Pigs.
J.Biol.Chem. 235, 165 (1960).
- 82) Zannoni, V.G., B.N. La Du:
Tyrosyluria Resulting from Inhibition of p-Hydroxyphenylpyruvic Acid
Oxidase in Vitamin-C-deficient Guinea Pigs.
J.Biol.Chem. 235, 2667 (1960).

Ich danke Herrn Professor Dr. P. Schölmerich dafür, daß ich die im Rahmen dieser Dissertation notwendigen Untersuchungen in den Laboratorien der Zweiten Medizinischen Universitätsklinik Mainz durchführen konnte.

Herr Privatdozent Dr. W. Gerok hat mich zur Bearbeitung des Themas angeregt. Seine wertvollen Ratschläge haben das Gelingen der Arbeit wesentlich gefördert. Hierfür gilt ihm mein besonderer Dank.

Herrn Dr. J. Dudeck danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

LEBENS LAUF

Am 27. Juni 1939 wurde ich als Sohn des selbständigen Zahnarztes Dr. Joachim Kannegießer und seiner Ehefrau Marianne Kannegießer, geb. Kluge, in Zwickau/Sachsen geboren.

Von 1945 bis 1953 besuchte ich die achtsstufige Grundschule in Lengenfeld/Vogtland. Von 1953 bis 1955 war ich Schüler der Aufbauoberschule in Lengenfeld. Nach weiterer zweijähriger Schulzeit an der Geschwister-Scholl-Oberschule in Auerbach/Vogtland bestand ich dort im Jahre 1957 die Reifeprüfung.

Ich studierte zunächst Mathematik an der Universität Leipzig. Im April 1958 ging ich nach Heidelberg und legte nach einem halbjährigen Kurs eine Sonderprüfung ab, mit der ich die Zulassung zum Hochschulstudium in der Bundesrepublik erwarb.

Im November 1958 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Universität Münster. In den folgenden Jahren studierte ich Medizin und Zahnmedizin an der Universität Erlangen.

1961 bestand ich dort die Zahnärztliche Vorprüfung, die Ärztlich-Naturwissenschaftliche Vorprüfung und die Ärztliche Vorprüfung. Nach einem klinischen Semester in Erlangen und fünfsemestrigem klinischen Studium an der Universität Mainz schloß ich das Medizinstudium am 17. Dezember 1964 mit der Ärztlichen Staatsprüfung in Mainz ab.

Vom 1. Januar 1965 bis 30. Juni 1966 war ich als Medizinalassistent vier Monate auf der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Schlüchtern, zehn Monate an der II. Medizinischen Universitätsklinik Mainz und vier Monate an der Universitätsfrauenklinik Mainz tätig.

